



* B R 1 0 2 0 2 1 0 1 7 7 6 4 A 2 *

República Federativa do Brasil

Ministério do Desenvolvimento, Indústria,
Comércio e Serviços

Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102021017764-0 A2

(22) Data do Depósito: 08/09/2021

(43) Data da Publicação Nacional:
21/03/2023

(54) **Título:** DISPOSITIVO MICROCHIP PARA CULTURA CELULAR E MÉTODO DE FABRICAÇÃO DO DISPOSITIVO

(51) **Int. Cl.:** B01L 3/00; G02B 21/34.

(52) **CPC:** B01L 3/502753; G02B 21/34.

(71) **Depositante(es):** UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - USP; UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO ? UNESP.

(72) **Inventor(es):** EMANUEL CARRILHO; ANA CAROLINA URBACZEK; PAULO AUGUSTO GOMES GARRIDO CARNEIRO LEÃO; FAYENE ZEFERINO RIBEIRO DE SOUZA; ANA JÚLIA PINTO FONSECA SIEUVE AFONSO; IRACILDA ZEPPONE CARLOS; JULIANA VIEIRA ALBERICE; LUCIANA TERESA DIAS CAPPELINI; JULIANE CRISTINA BORBA; JANICE RODRIGUES PERUSSI; MA HUI LING.

(57) **Resumo:** DISPOSITIVO MICROCHIP PARA CULTURA CELULAR E MÉTODO DE FABRICAÇÃO DO DISPOSITIVO. A presente invenção se refere a um microdispositivo ou microchip para cultura celular que tem aplicação em mimetizações biológicas e ao método de fabricação do dispositivo. O dispositivo é capaz de ser uma plataforma para testes celulares dinâmicos, utilizando células humanas, imortalizadas ou não, passíveis de serem mantidas em cultura, e substituindo o uso de animais, a fim de obter respostas mais próximas das encontradas em seres humanos. O dispositivo microchip em questão pertence ao setor técnico da microfabricação e microfluídica dos órgãos-em-chips. O dispositivo apresenta-se como uma plataforma para testes biológicos que poderá ser aplicada em diversos campos da ciência biológica, biomédica, bioquímica, farmacêutica, cosmética e médica, como por exemplo, em ensaios toxicológicos, farmacológicos, imunológicos, metabólicos, entre outros.



FIGURA 1

**DISPOSITIVO MICROCHIP PARA CULTURA CELULAR E MÉTODO DE
FABRICAÇÃO DO DISPOSITIVO**

Campo de Invenção

[001] A presente invenção se refere a um dispositivo microchip para cultura celular e o método de fabricação do dispositivo. A invenção se insere no ramo dos aparelhos físicos ou químicos de medição, mais especificamente na investigação ou análise dos materiais pela determinação de suas propriedades químicas ou físicas, mais especificamente ainda aos dispositivos para cultura celular e mimetizações biológicas para estudos farmacológicos e toxicológicos de substâncias químicas, nanopartículas e outras espécies biologicamente ativas.

Fundamentos da Invenção

[002] Em organismos multicelulares, os tecidos são formados por diferentes tipos de células que são organizadas tridimensionalmente (3D) em conjuntos cooperativos. As variedades de tecidos, por sua vez, se combinam para formar unidades funcionais maiores chamadas órgãos. No microambiente do órgão, as células sofrem variação dinâmica de órgão específico, como gradientes químicos e forças mecânicas (isto é, compressão e tensão de fluidos). Essas forças são cruciais para o crescimento, sobrevivência, resposta e funcionalidade das células, tecidos e órgãos. Assim, para compreender a patologia humana, a investigação de como as células e os tecidos desempenham juntos suas funções são de extrema importância.

[003] As culturas de células são onipresentes na biologia celular, bioquímica, descoberta e desenvolvimento de medicamentos, estudos farmacocinéticos e engenharia de

tecidos. As investigações fundamentais da biologia humana e o desenvolvimento de drogas terapêuticas, comumente contam com sistemas de cultura de células em monocamada bidimensional (2D) ou modelos animais. No entanto, os sistemas de cultura de células 2D não recapitulam com precisão a estrutura, função, fisiologia dos tecidos vivos, bem como ambientes 3D altamente complexos e dinâmicos *in vivo*. Por isso, muitos estudos envolvendo fisiologia e patologia exigem o uso de modelos animais que apresentam diversos problemas, tais como: altos custos, questões éticas, e, em muitos casos, esses modelos não são aplicáveis para prever e reproduzir respostas humanas. Assim, modelos animais e modelos *in vitro* são modelos ineficazes na previsão de respostas *in vivo* devido à diferença entre espécies e/ou falta de ambiente de tecido 3D fisiologicamente relevante.

[004] Por esse motivo, as limitações do uso da cultura de células e dos modelos animais existentes são o estímulo para o desenvolvimento de novos modelos alternativos *in vitro* que possam mimetizar melhor a complexa funcionalidade estrutural dos órgãos. Assim, avanços consideráveis estão sendo feitos neste campo como resultado de aplicações de engenharia de microssistemas em culturas de células. As técnicas de microfabricação permitem o desenvolvimento de microchips que possibilitam um controle preciso da célula, posição, função e respectiva organização do tecido em culturas altamente estruturadas.

[005] Além disso, quando a tecnologia microfluídica está associada a microchips, isso permite um controle mais dinâmico do fluxo e da pressão do fluido, permitindo a

criação de um microambiente ao redor das células que origina vários gradientes químicos e sinais mecânicos dinâmicos, que são capazes de induzir respostas celulares próximas imitando um microambiente semelhante ao fisiológico.

[006] Esses dispositivos biomiméticos para estudo biológico de células, tecidos e órgãos são denominadas de órgãos-em-chips, uma vez que podem imitar o ambiente *in vivo* e, subsequentemente, respostas semelhantes ao *in vivo*, gerando um modelo realista de órgãos humanos de interesse, que pode fornecer modelos relevantes para a fisiologia humana. O desenvolvimento de um órgão em um chip veio da fusão de métodos de microengenharia, como tecnologia de microfluídica e biologia celular. Órgãos em um chip reconstituem os arranjos estruturais dos tecidos e se assemelham à complexidade funcional dos órgãos. O uso de culturas de células em estruturas microfluídicas cria uma microarquitetura celular e um microambiente celular, que influenciam as respostas celulares.

[007] Órgãos-em-chips são dispositivos que permitem estudar *in vitro* diversos processos biológicos (fisiológicos e patológicos) que não eram possíveis de observar em sistemas convencionais de cultura de células ou em modelos animais. A partir desta tecnologia, *organ-on-chip* produziu-se vários modelos de cultura de células em 3D, imitando órgãos como pulmões, fígado, rim, córnea, redes neurais e modelos para estudos de patologia, como câncer de mama. Esses modelos de órgão em um chip permitem a interface tecido-tecido como células epiteliais/mesenquimais ou parenquimatosas/endoteliais, permitindo assim a interação do tecido por meio de comunicação química, nutrientes,

hormônios, metabólitos, citocinas, sinais físicos e forças fluídicas fisiológicas, representando com mais precisão o que ocorre no órgão vivo.

[008] É de conhecimento do estado da técnica um procedimento para fabricar sistemas microfluídicos fechados usando um polímero, que tornou mais popular a fabricação de dispositivos microfluídicos, poli (dimetilsiloxano) (PDMS). Essa técnica permitiu a produção de microdispositivos em menos de 24 horas, o que representou uma redução significativa no tempo de fabricação em comparação à produção de microchip de vidro.

[009] A busca por materiais alternativos e métodos mais fáceis de fabricação tem sido vasta, e no estado da técnica já foi exposto a microfabricação de poliéster-toner (PT) como um processo viável para produzir dispositivos microfluídicos que eram simples de produzir e de baixo custo. O método PT usa uma camada de toner depositada em um filme de poliéster que define os canais microfluídicos, além disso, o toner serve como adesivo para selar o dispositivo por meio de uma etapa de laminação a quente. Assim, os microchips de toner de poliéster (PT) representam uma plataforma muito promissora para análises químicas e bioquímicas.

[0010] Usando essa abordagem, vários tipos de microchips (PT) foram criados para análise de DNA, análises enzimáticas para detecção colorimétrica de proteína, glicose e colesterol em amostras de soro e análises farmacêuticas. Neste documento, é relatado um modelo alternativo para cultura de células sob perfusão que imita um vaso sanguíneo, que se destina a estudar a resposta

inflamatória e toxicidade, proporcionando melhores resultados do que os modelos animais ou culturas de células convencionais (arquitetura de células não 3D).

[0011] Diante do exposto, a presente invenção busca solucionar as referidas limitações no campo técnico em questão e descreve um dispositivo microchip para cultura celular e o processo de fabricação do dispositivo com diversas vantagens em relação aos já compreendidos no estado da técnica, principalmente vantagens que podem levar à produção em larga escala para públicos variados.

[0012] Dentre as vantagens da presente invenção, é possível destacar que o dispositivo é de baixo custo, os materiais utilizados são materiais de escritório de fácil acesso e valor financeiro relativamente baixo, além de não serem tóxicos e serem biocompatíveis para vários tipos de células. Ademais, é de fácil e rápida fabricação e permite a elaboração de diferentes *designs* do canal para cultura celular. O sistema PT permite grande flexibilidade na arquitetura do dispositivo, possibilitando sistema em duas ou três dimensões e a laminação de múltiplas camadas.

Estado da Técnica

[0013] No documento BR1020120122936A2 é descrito um dispositivo microfluídico para realizar testes rápidos de interesses clínico, sendo aplicada no monitoramento e tratamento de ensaios biológicos envolvendo reagentes específicos que promovam alteração de cor, podendo ser explorado em diagnósticos clínicos, monitoramento de espécies clinicamente importantes e outras aplicações biomédicas. Entretanto, a invenção apresenta certas limitações, uma vez que utiliza a capilaridade para bombear

o líquido, e, dependendo da densidade e viscosidade do líquido, este pode ou não percorrer pelo canal. Já a presente invenção utiliza uma bomba de seringa, por isso, independe do tipo de líquido, sendo possível através dessa fonte externa bombear o líquido. Além disso, o fluxo e a pressão exercida pelo líquido são controláveis e calculáveis. Ainda, a detecção colorimétrica utilizada no documento é restrita ao limite de detecção do método analítico empregado, ou seja, se uma amostra não possui a quantidade suficiente de analito para ser detectada, o dispositivo perde sua função. A presente invenção visa à análise biológica e estudos afins, é provado que as células de mamíferos proliferam adequadamente no dispositivo, e é possível utilizar simplesmente o microscópio ótico para acompanhar a alteração morfológica e a viabilidade celular após a administração de drogas, demonstrando a eficiência da presente invenção e que não há restrição do tipo de célula cultivada ou de droga testada.

[0014] No documento US9150907B2 é descrito um sistema microfluídico, que menciona o uso de filmes de: poliamida, adesivo sensível à pressão ou termoplástico, elastômero termoplástico ou películas de elastômero de silicone etc., além de uma camada adesiva para conexão das camadas superiores e inferiores. Entretanto, muito embora os materiais de fabricação sejam os mesmos, o modo de fabricação do chip é totalmente diferente assim como o propósito para o qual o microchip é utilizado. Além disso, o termo "cell" que é usado, não se refere à célula biológica, mas como cela, já que na presente invenção usa-se culturas biológicas e no documento não. Além disso, não

seria possível usar o chip do documento para aquele proposto pela presente invenção já que as exigências de cultivo necessitam de características de assepsia, de aderência e de oxigenação que o presente dispositivo microchip fornece, enquanto o chip descrito no documento não. Não seria possível essa adaptação porque a incorporação da cultura celular é feita quando do estabelecimento do chip, não sendo possível a adaptação de uma cultura a um chip previamente estabelecido.

[0015] No documento US8470110B2 é protegido um método de fabricação de uma câmara de amostra com uma placa de cobertura e uma placa de fundo unida a ela de maneira fixa, em que um recesso ou um sulco é produzido na placa de cobertura de modo que um reservatório é formado pela placa de fundo. As principais diferenças se pautam principalmente no fato de o dispositivo do documento apresentar uma placa inferior contendo orifícios que têm um arranjo e tamanho predeterminados. Além disso, o material utilizado para a fabricação do dispositivo do documento citado é um conjunto de diversos polímeros. Outra diferença entre os dispositivos é que o documento tem como objetivo fornecer uma câmara de amostra na qual moléculas e células podem ser visualizadas e examinadas por métodos de alta resolução como microscopia de luz transmitida, microscopia de fluorescência, microscopia confocal, entre outras. Assim, não tem como propósito o cultivo de células, ainda mais, células de diversas naturezas, como é proposto na presente invenção. A junção das camadas superiores e inferiores deve ser, preferencialmente, realizada por tratamento térmico, enquanto na presente invenção é feita por um filme adesivo

biocompatível, sem a necessidade de selagem. Ainda, o dispositivo do documento citado necessita de um tratamento com plasma em seus reservatórios, passo que foi eliminado na presente invenção.

[0016] No documento US7582264B2 é abordado um dispositivo para análises de microfluidos para um substrato com superfície de base plana e superfície de cobertura, em que uma câmara é integrada no substrato para receber líquido com pelo menos duas admissões e uma membrana semipermeável ou permeável disposta na câmara, sendo subdividida pela membrana em duas câmaras seccionais com pelo menos uma admissão cada. A principal diferença do dispositivo do documento citado é o fato dele apresentar na placa inferior orifícios que têm um arranjo e tamanho predeterminados, o que não é observado na presente invenção. Neste dispositivo é acrescentado uma membrana para selecionar partículas a serem analisadas, sendo esta membrana o diferencial das reivindicações do documento citado, pois discute bastante quimiotaxia. A presente invenção não apresenta membrana como diferencial, mesmo podendo incorporar uma ou mais destas, em vários estágios do dispositivo.

[0017] E por fim, no documento US20110082563A1 é possível notar que as semelhanças com a presente invenção se pautam principalmente no fato de ambas relatarem um microdispositivo para cocultura de células, entretanto, enquanto o dispositivo da presente invenção possui três camadas: base de poliéster, adesivo dupla face biocompatível e topo de poliestireno ou polipropileno, o microdispositivo do documento citado compreende duas camadas de material polimérico separadas por uma membrana

permeável ou semipermeável. Além disso, no dispositivo do referido documento, as camadas são dispostas uma sobre a outra e separadas pela membrana permeável ou semipermeável. Cada camada define um ou mais microcanais que podem se comunicar com os microcanais da outra camada. Já no microdispositivo desenvolvido na presente invenção, a comunicação entre as culturas celulares se dá lateralmente através de uma membrana de ágar, o que facilita a confecção do microdispositivo. Ainda, diversos materiais foram avaliados quanto à toxicidade das células, sendo que poliéster, adesivo dupla face biocompatível e poliestireno ou polipropileno são os mais adequados para desenvolvimento e aderência celular, além de não necessitarem de nenhum tratamento prévio para o cultivo. Destaca-se ainda, o fato de o microdispositivo poder ser reaproveitado mais de uma vez sem consequência no crescimento celular.

Breve descrição da invenção

[0018] A presente invenção se refere a um microdispositivo ou microchip para cultura celular que tem aplicação em mimetizações biológicas. O dispositivo é capaz de ser uma plataforma para testes celulares dinâmicos, utilizando células humanas, imortalizadas ou não, passíveis de serem mantidas em cultura, e substituindo o uso de animais, a fim de obter respostas mais próximas das encontradas em seres humanos. O dispositivo microchip em questão pertence ao setor técnico da microfabricação e microfluídica dos órgãos-em-chips e apresenta-se como uma plataforma para testes biológicos que pode ser aplicada em diversos campos da ciência biológica, biomédica, bioquímica, farmacêutica, cosmética e médica, como por

exemplo, em ensaios toxicológicos, farmacológicos, imunológicos, metabólicos, entre outros.

Breve descrição das figuras

[0019] Na FIGURA 1 é mostrado um esquema com os três modelos de dispositivos microchips produzidos e suas principais diferenças químicas, estruturais e procedimentais.

[0020] Na FIGURA 2 é mostrado o primeiro modelo (Modelo 1) de microchip fabricado na presente invenção, com dois filmes de poliéster e toner de impressora à laser.

[0021] Na FIGURA 3 é mostrado o segundo modelo (Modelo 2) de microchip fabricado na presente invenção, fabricado com modificações feitas a partir do Modelo 1, e com modificações químicas e biológicas da superfície.

[0022] Na FIGURA 4 é mostrado o terceiro modelo (Modelo 3) de microchip fabricado utilizando uma lâmina plástica biocompatível estéril e adesivo dupla face biocompatível e filme de poliéster.

[0023] Na FIGURA 5 é mostrado um fluxograma do método de fabricação do dispositivo microchip correspondente ao Modelo 3.

Descrição detalhada da invenção

[0024] A presente invenção descreve um dispositivo microchip para cultura celular e o método de fabricação do dispositivo. O objetivo desta invenção é a criação de um dispositivo biomimético, capaz de ser uma plataforma para testes celulares dinâmicos, utilizando células humanas passíveis de serem mantidas em cultura, e substituindo o uso de animais, a fim de obter respostas mais próximas das encontradas em seres humanos.

[0025] Até a obtenção do dispositivo microchip otimizado, de baixo custo, e que apresentou os melhores resultados nos testes para a referida aplicação, que é o dispositivo correspondente ao Modelo 3, foram desenvolvidos três modelos, conforme mostrado na FIGURA 1.

[0026] O primeiro modelo de microchip foi criado utilizando um *software* gráfico. O dispositivo foi fabricado com dois filmes de poliéster e toner de impressora a laser. Coroas de ponteiros de 200 µL (chamados de conectores fêmea) foram coladas ao redor dos orifícios do filme de poliéster para adaptação de tubos de silicone tipo escalpe que levam as células até a câmara de cultivo do microchip. A FIGURA 1 faz uma representação esquemática deste modelo de microchip.

[0027] Na FIGURA 2 é representado o desenho e a estrutura de montagem do microchip do Modelo 1. Os substratos, superior (TL) e inferior (BL), são produzidos a partir da impressão direta à laser, em que uma camada de toner delimita um canal com dimensões micrométricas e milimétricas nas faixas de 6-10 µm de altura, 10-30 mm de comprimento, 0,1-20 mm de largura e dois círculos de 1-5 mm de diâmetro em cada extremidade, ou quantas entradas e saídas forem necessárias para cada canal. Para acesso ao microcanal, a camada superior (TL) dispõe de orifícios de acesso. A seguir, procede-se com a montagem propriamente do microchip que consiste em alinhar e unir as camadas TL e BL por laminação a quente. Desta forma, além da camada de toner delimitar as dimensões do microcanal, ela também promove a adesão entre as camadas constituintes do microchip, por meio da fusão do toner durante a etapa de laminação

assistida com calor. Na etapa seguinte, conectores tipo-fêmea são fixados nos orifícios de acesso presentes na superfície do microdispositivo já laminado.

[0028] A estes conectores são encaixadas mangueiras de silicone, por onde as células serão inseridas no microchip e ocorrerá a perfusão de meio de cultura. Com o dispositivo finalizado, injeta-se no microcanal um volume de células em suspensão (1×10^5 a 5×10^6 células/mL), para que essa suspensão preencha todo o comprimento do canal.

[0029] Após o preenchimento total do canal, os orifícios são cobertos e levados a incubação em estufa (37°C , atmosfera de 5% de CO_2) por 1-4 h. Aproximadamente 1 hora seguinte ao procedimento descrito, o dispositivo já está preenchido com a cultura celular e é direcionado para um microscópio invertido para observação das células contidas dentro do canal.

[0030] Na etapa seguinte, o dispositivo é conectado a bomba seringa, por meio das mangueiras de silicone, e o canal é perfundido com o meio de cultura apropriado para crescimento de células sob uma vazão contínua de 0,5-5 $\mu\text{L}/\text{min}$, podendo ser unidirecional ou não.

[0031] O segundo modelo de sistema órgão-em-chip de PT (Modelo 2) é desenvolvido a partir de modificações do Modelo 1. Este é montado da mesma forma como descrito para o modelo 1, entretanto, as câmaras de cultivo celular foram tratadas com modificações químicas e biológicas da superfície. Entre os tratamentos típicos, pode-se citar plasma de oxigênio (70-300 mtorr, 40-100 watts e 20-60 segundos) e fibronectina (o uso de 1-5 μg em solução salina de tampão fosfato (PBS) para cada 1 cm^2 da área do microcanal

e incubar por 24 h, pelo menos. A FIGURA 3 faz uma representação esquemática deste modelo de microchip.

[0032] Na FIGURA 3, é representado o desenho e a estrutura de montagem do microchip modelo 2. Os substratos superior (TL) e inferior (BL) são produzidos a partir da impressão direta a laser, em que uma camada de toner delimita um canal com dimensões micrométricas e milimétricas, 6-10 μm de altura, 20-50 mm de comprimento, 0,1-30 mm de largura e dois círculos (entrada e saída) de 1-5 mm de diâmetro em cada extremidade.

[0033] Para acesso ao microcanal, a camada superior (TL) dispõe de orifícios de acessos, sendo um conector do tipo fêmea adicionado para facilitar o encaixe de mangueiras de silicone para a operação fluídica do microchip. Uma camada intermediária adicional (ML), recortada com o auxílio de uma cortadora a laser de CO_2 , amplia as dimensões da câmara onde será realizado o cultivo de células.

[0034] Após a confecção das respectivas camadas TL, ML e BL, essas são alinhadas e unidas por laminação a quente. Além da camada de toner delimitar as dimensões do microcanal, ela também promove a adesão entre as camadas constituintes do microchip, por meio da fusão do toner durante a etapa de laminação assistida com calor e pressão.

[0035] Após o desenho e impressão do *design* do microdispositivo, este é tratado com plasma de oxigênio para modificação das propriedades da superfície do dispositivo. Após o tratamento, os orifícios de acessos são criados na superfície superior (TL) do dispositivo e estes alinhados aos canais presentes nas demais camadas e laminados termicamente.

[0036] Em seguida são colados os conectores tipo-fêmea aos orifícios de acesso na TL e a estes são fixadas mangueiras de silicone. Os dispositivos são tratados, lavados e é realizada a injeção das células. Após injeção das células, o dispositivo agora com os canais preenchidos é direcionado para etapa de incubação em estufa.

[0037] Após a incubação, o dispositivo é posicionado em um microscópio invertido para observação das células dentro do canal. Em seguida, por meio de mangueiras de silicone, o microdispositivo é conectado à bomba seringa para infusão do meio de cultura com vazão unidirecional contínua de 0,5-5 $\mu\text{L}/\text{min}$.

[0038] O terceiro modelo de microchip (Modelo 3) foi desenhado em um software gráfico e montado utilizando uma lâmina plástica biocompatível estéril (de materiais como: poliestireno, polipropileno etc.), adesivo dupla face biocompatível recortado a laser e filme de poliéster. Coroas de ponteiros de 200 μL foram coladas ao redor dos orifícios do filme de poliéster para facilitar a adaptação de tubos de silicone tipo escalpe que levam as células até as câmaras de cultivo. A FIGURA 4 faz uma representação esquemática deste modelo de microchip.

[0039] Na FIGURA 4 é representado o desenho, as dimensões e a estrutura de montagem do microchip modelo 3. a) lâmina plástica biocompatível estéril (de materiais como: poliestireno, polipropileno etc.), b) adesivo dupla face biocompatível recortado e c) filme de poliéster. O canal de crescimento celular possui dimensões micrométricas e milimétricas que podem variar de 100 a 200 μm de altura, 20-50 mm de comprimento, 0,1-30 mm de largura e dois

círculos de 1-5 mm de diâmetro em cada extremidade. O adesivo tem a função de promover a aderência entre as partes superior (a) e inferior (c), e delimitar o canal. Para acesso ao microcanal, a camada superior (c) dispõe de orifícios de acesso, sendo um conector do tipo fêmea adicionado para facilitar o encaixe de mangueiras de silicone para a operação fluídica do microchip.

[0040] Para a fabricação dos microchips de PT do Modelo 1 é realizado o processo de impressão direta em filme de poliéster. O processo é baseado na impressão de um padrão de imagem em um filme de poliéster seguido de uma etapa de laminação a quente.

[0041] Os desenhos das microcâmaras para preenchimento celular foram realizados através de um software de processamento de imagem e artes gráficas, sendo definidas por dimensões de até 1-5 cm de comprimento e 0,1-0,5 cm de largura. A estrutura desejada foi impressa no filme de poliéster utilizando toner de uma impressora a laser.

[0042] Assim, a estrutura da microcâmara no dispositivo microfluídico foi definida pelo filme de poliéster e pelo toner, sendo a base dos canais constituída pelo filme de poliéster e as paredes pelo toner. A altura da câmara foi definida aplicando uma camada de toner em dois filmes, que após serem vedados juntos formaram uma câmara com 10-14 μm de altura. Em um dos filmes de poliéster foram produzidos 2 furos de 2 mm, com um perfurador de papel, para criar orifícios de acesso à câmara de crescimento celular.

[0043] A vedação das câmaras é realizada pelo processo de laminação térmica utilizando uma laminadora operando de 115 a 130 °C. Nesta temperatura ocorreu a fusão do toner e a vedação do dispositivo.

[0044] Após a laminação, bases de ponteiros de pipetas de 200 µL (conectores fêmeas) foram coladas com uma resina epóxi para criar os reservatórios de encaixe ao tubo de silicone acoplado à seringa que foi impulsionada por uma bomba de seringa.

[0045] A maioria dos polímeros apresenta superfícies quimicamente inertes e com baixa energia livre superficial, o que os torna não receptivos à aderência de determinadas substâncias e de células, demonstrando assim, a necessidade da realização de um tratamento nesta superfície para proporcionar melhores condições para aderência celular.

[0046] A interação do plasma de oxigênio com filmes poliméricos causa principalmente mudanças na polaridade da superfície, melhorando a adesão celular. Além disso, o tratamento por plasma torna a superfície estéril através da destruição de microrganismos, eliminando bactérias, fungos e vírus. Assim, o poliéster já impresso com o toner foi tratado com plasma de oxigênio, antes da montagem do microchip de PT, mais precisamente, antes da etapa de laminação.

[0047] O layout dos microchips de PT, produzido em software de imagem, foram estampados por impressão direta a laser com toner em filme de poliéster, com as seguintes dimensões 2-5 cm comprimento e 1-3 mm de largura.

[0048] A altura da câmara foi definida pela impressão da imagem com camada de toner única aplicada sobre os dois

filmes de poliéster que formaram a parte superior e inferior do microchip e um filme intermediário sem impressão.

[0049] As partes superior e inferior, já impressas, foram tratadas com plasma de oxigênio e na sequência, no filme pertencente à parte superior do microchip foram produzidos 2 furos de 1-5 mm com um perfurador de papel, para criar orifícios de acesso ao canal para injeção celular.

[0050] Entre a parte superior e inferior foi colocado um filme de poliéster com o formato do canal recortado. As três partes foram laminadas juntas e formaram uma câmara com, aproximadamente, 112 µm de altura.

[0051] A vedação das câmaras foi realizada pelo processo de laminação térmica a 120 °C. Nesta temperatura ocorre a fusão do toner e a vedação do dispositivo. Após a laminação, bases de ponteiros de pipetas de 100 µL (conectores fêmeas) foram coladas com uma resina epóxi para criar os reservatórios.

[0052] O método visa à incorporação de biomoléculas, geralmente macromoléculas, na superfície de materiais, a fim de promover o reconhecimento da superfície pelas células, proporcionando maior adesão, com posterior proliferação.

[0053] Assim, os microchips já montados foram tratados com 50 µL de solução de fibronectina bovina na concentração de 10 µg/mL, adicionado em um dos reservatórios e incubado durante a noite, a 4 °C. Antes da injeção da suspensão celular, o canal foi lavado com PBS para retirar o excesso de solução e os microchips foram deixados na estufa a 37 °C por 1-4 horas.

[0054] Os plásticos biocompatíveis (de materiais como: poliestireno, polipropileno etc.) das lâminas utilizadas para a fabricação da terceira geração dos microchips para cultivo celular apresentam uma boa superfície para a adesão e o crescimento celular. Além disso, este material apresenta características ideais para a microfabricação como: excelente resistência química, transparência adequada para microscopia óptica e baixa autofluorescência permitindo o preparo de amostra e a visualização adequada das células.

[0055] O *layout* da câmara para crescimento celular foi desenhado em um software gráfico sendo as dimensões definidas por 20-50 mm de comprimento e 0,1-30 mm de largura. Em seguida, com auxílio de uma cortadora a laser, a câmara interna foi recortada em um adesivo dupla face biocompatível, que além de delimitar a área e a altura da câmara uniu o substrato superior e inferior do microdispositivo.

[0056] Previamente à montagem do microdispositivo, no substrato superior (filme de poliéster) foram feitos dois furos de 1 a 5 mm com um furador de papel para acesso à câmara de crescimento celular.

[0057] O microchip foi selado fazendo-se um sanduíche com lâmina plástica/adesivo dupla face biocompatível/poliéster e então, coroas de ponteiros de 200 μ L (conectores fêmeas) foram coladas ao redor dos furos para facilitar a adaptação de tubos de silicone que levariam as células até as câmaras.

[0058] O dispositivo apresentado na FIGURA 4 consiste no Modelo 3 e sua montagem. Este possui três

camadas, sendo que cada camada corresponde a um substrato diferente. O substrato inferior (BL) corresponde à placa de polipropileno, o substrato superior (TL) ao filme de poliestireno e o substrato intermediário que é um adesivo biocompatível.

[0059] O substrato intermediário, adesivo biocompatível, confere ao dispositivo a altura de canal de 100 a 150 μm e ainda delimita o canal de 20-50 mm de comprimento, 0,1-30 mm de largura. Além disso, o substrato intermediário é responsável por fixar os substratos inferior (BL) e superior (TL) como uma cola com a aplicação de pressão com a mão, tornando desnecessária a etapa de selagem térmica.

[0060] O dispositivo finalizado ainda conta com os orifícios de acesso onde são fixados os conectores tipo-fêmea. Na FIGURA 5, temos o esquema detalhado da produção do Modelo 3 do dispositivo. A primeira etapa consiste no corte do adesivo biocompatível (etapa a), seguido da imersão dos demais substratos em álcool 70% para esterilização (etapa b).

[0061] Todos os substratos são expostos à luz UV (etapa c) para complementar a esterilização. O adesivo biocompatível é aplicado na placa de polipropileno (etapa d) após a remoção do *liner* e pressionado com os dedos para total fixação. Após fixada a camada intermediária, é adicionado um delimitador (etapa e) ao canal do dispositivo para adição de ágar bacteriológico (etapa f), o qual formará uma barreira para 8 mm. O delimitador é removido (etapa g) e a camada superior já contendo os orifícios de acesso é fixada ao adesivo biocompatível intermediário (etapa h)

apenas com a remoção do *liner* do adesivo e aplicação de pressão com os dedos na superfície do dispositivo.

[0062] Por fim, são fixados os conectores tipo-fêmea (etapa i) e conectadas as mangueiras de silicone. Duas linhagens diferentes de células, por exemplo células *Verda Reno* (VERO) e endoteliais umbilical venosa humana (HUVEC), são adicionadas separadamente na câmara 1 e na câmara 2, seguido por incubação em estufa (etapa j). Após a etapa de incubação, o dispositivo é posicionado em um microscópio invertido para observação das células (etapa k). A bomba seringa é conectada ao dispositivo (etapa l) por meio das mangueiras de silicone e é realizada a infusão do meio de cultura sob uma vazão de 2 $\mu\text{L}/\text{min}$.

[0063] Como novos materiais para a biologia celular, o toner de poliéster se mostrou atóxico para as células endoteliais da umbilical venosa humana em ensaios de citotoxicidade.

[0064] Após 1-4 horas da injeção da suspensão de células no microcanal, estas demonstraram morfologia alongada indicando boa adesão celular no substrato, devido ao tratamento do microchip com plasma de oxigênio e fibronectina.

[0065] Com o acoplamento do microchip a uma bomba de seringa, as células podem atingir a confluência de 80% em 24 horas e suportar uma tensão de cisalhamento de fluido de até 4 dyne cm^{-2} por 48 horas, permanecendo com a melhor adesão e proliferação celular, enquanto a perfusão do meio de cultura no microchip foi fundamental para a sobrevivência celular.

[0066] Além disso, como a microfabricação dos dispositivos se mostrou muito prática e simples, seria de se esperar que essa tecnologia pudesse ser replicada em vários laboratórios, sendo uma alternativa à tradicional cultura de células estáticas.

[0067] No futuro, essa plataforma também poderá ser preferível ao uso de modelos animais quando produzidos na forma de *organ-on-chips* estruturados, com a vantagem de ser produzida com baixo custo, fácil fabricação e tempo reduzido em relação aos chips PDMS e outras técnicas de microfabricação mais elaboradas.

[0068] As vantagens dos microchips PT também podem incluir *design* de estrutura variável, flexibilidade na microfabricação e combinação de materiais, o que pode facilitar o estudo sistemático de "órgão em um chip". Os microchips biomiméticos PT podem ser aplicados para uma variedade de finalidades e isso pode acelerar o avanço do conhecimento nesta área de pesquisa.

[0069] Diante do exposto, os microchips aqui apresentados possuem potencial para se tornarem plataformas promissoras para análises. As principais vantagens são devidas a simplicidade de fabricação dos dispositivos, sem a necessidade da utilização de maquinário, rapidez, tanto de matéria-prima quanto da instrumentação para o processo de fabricação, a possibilidade de reutilização do dispositivo diminuindo a necessidade de descarte, que o torna sustentável. Além do fato de apresentar melhor performance quando comparado com dispositivos similares presentes no estado da técnica, uma vez que a altura do canal do presente dispositivo facilita a inserção da

suspensão celular, sem presença de bolhas, além de favorecer a formação de uma monocamada celular mais uniforme.

REIVINDICAÇÕES

- 1) Dispositivo microchip para cultura celular, **caracterizado** pelo fato de compreender uma estrutura multicamada e consistir em
 - a) pelo menos uma lâmina plástica biocompatível estéril (BL),
 - b) pelo menos um adesivo dupla-face biocompatível,
 - c) pelo menos um filme de poliéster com dois orifícios de acesso a câmara de cultivo celular (TL).
- 2) Dispositivo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de dois conectores fêmeas serem inseridos ao redor dos orifícios do filme de poliéster.
- 3) Dispositivo, de acordo com as reivindicações 1 e 2, **caracterizado** pelo fato de os conectores serem um conector de entrada e outro de saída.
- 4) Dispositivo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de a lâmina biocompatível compreender preferencialmente poliestireno e polipropileno.
- 5) Dispositivo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de os orifícios de acesso do filme de poliéster compreender coroas de ponteiros de 100 a 200 µL.
- 6) Dispositivo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de os orifícios de acesso possibilitarem o contato com o microcanal de crescimento celular.

- 7) Dispositivo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de os orifícios de acesso terem de 1 a 5 mm de diâmetro.
- 8) Dispositivo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de as células serem inseridas através das coroas de ponteiros pelas mangueiras de silicone.
- 9) Dispositivo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de o canal de crescimento celular possuir dimensões que podem variar de 100 a 150 µm de altura, 20 a 50 mm de comprimento, 0,1 a 30 mm de largura.
- 10) Dispositivo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de opcionalmente a câmara de cultivo celular ser tratada com plasma de oxigênio (70 a 300 mtorr, 40 a 100 watts e 20 a 60 segundos) e/ou fibronectina.
- 11) Dispositivo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de as células atingirem confluência de 80% em 24 horas.
- 12) Dispositivo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de as células suportarem uma tensão de cisalhamento de fluido de até 4 dine cm⁻² por 48 horas.
- 13) Método de fabricação do dispositivo, conforme definido nas reivindicações de 1 a 12, **caracterizado**, pelo fato de compreender as etapas de

- a) Corte do adesivo dupla-face biocompatível e da placa de polipropileno,
 - b) Imersão dos materiais em álcool 70% para esterilização,
 - c) Exposição dos materiais à luz UV,
 - d) Aplicação do adesivo dupla-face biocompatível na placa de polipropileno,
 - e) Delimitação da barreira com adesivo plástico,
 - f) Adição da barreira de ágar bacteriológico,
 - g) Remoção do delimitador,
 - h) Adição da camada superior perfurada para acesso à câmara de cultura celular,
 - i) Colagem dos conectores fêmea e acoplamento à mangueira de silicone,
 - j) Injeção de células na câmara 1 e na câmara 2 seguido de incubação,
 - k) Observação das células em microscópio após 4 a 48 horas,
 - l) Conexão à bomba de seringa para infusão de meio de cultura.
- 14) Método, de acordo com a reivindicação 13, **caracterizado** pelo fato de o dispositivo ser posicionado em um microscópio invertido para observação das células após a etapa de incubação (j).



FIGURA 1

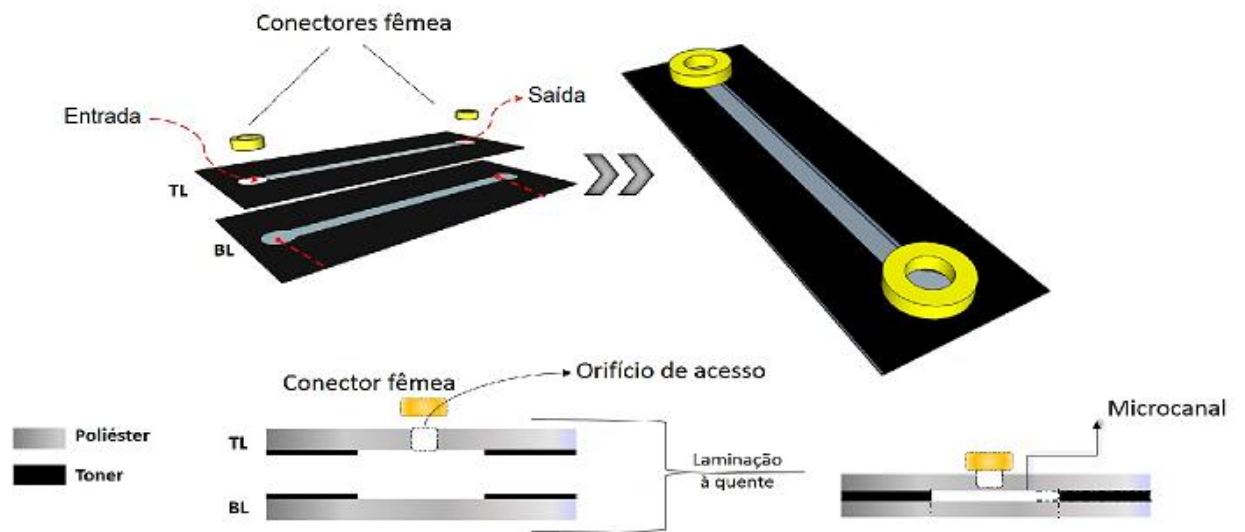


FIGURA 2

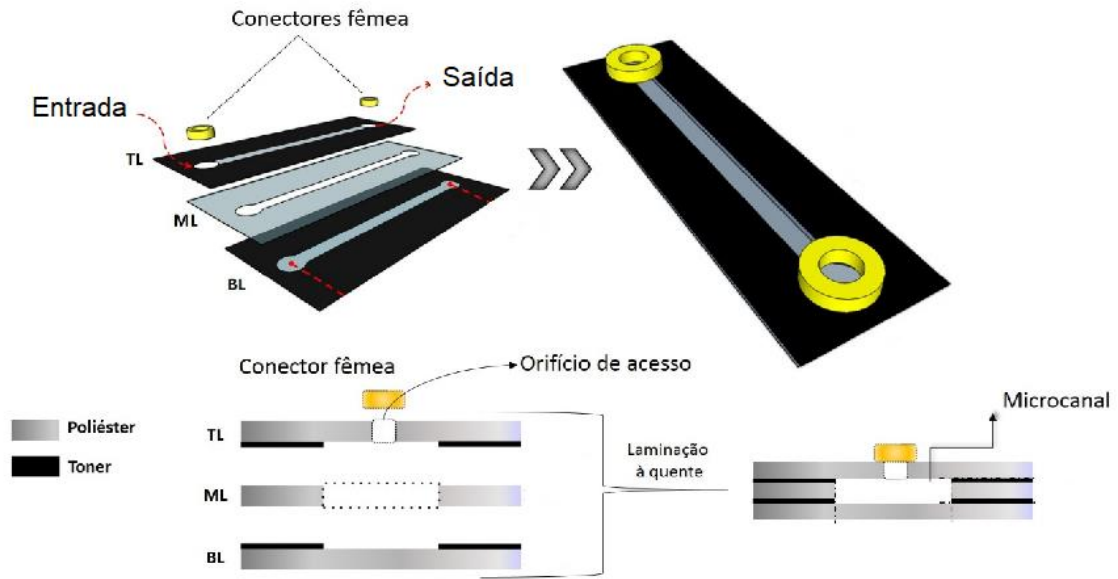


FIGURA 3

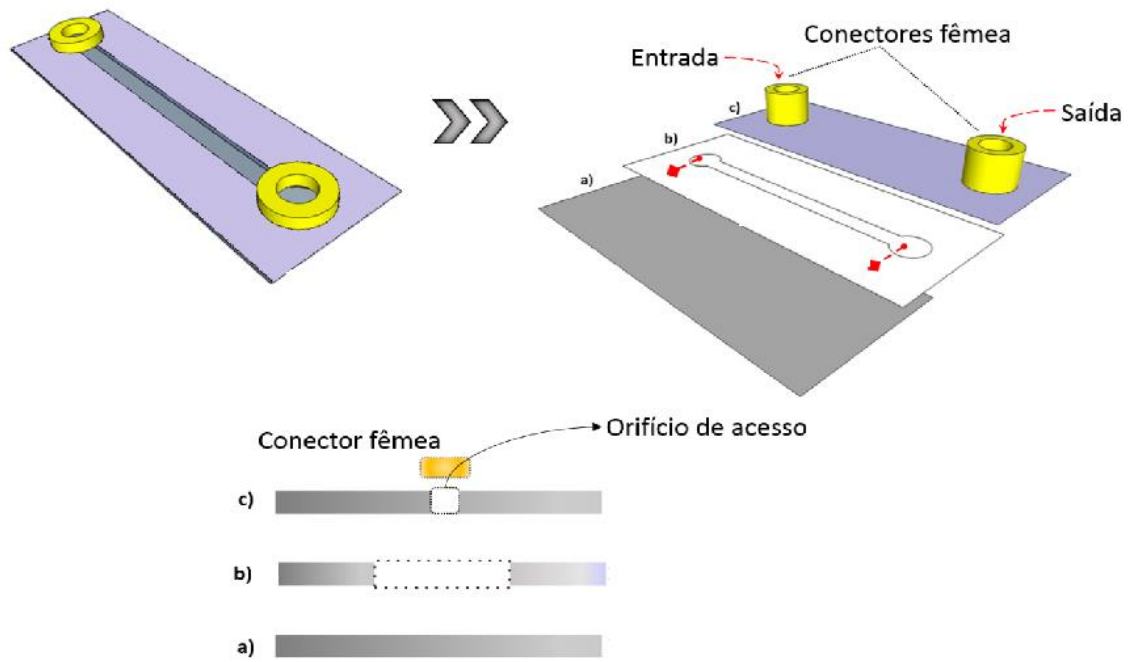


FIGURA 4

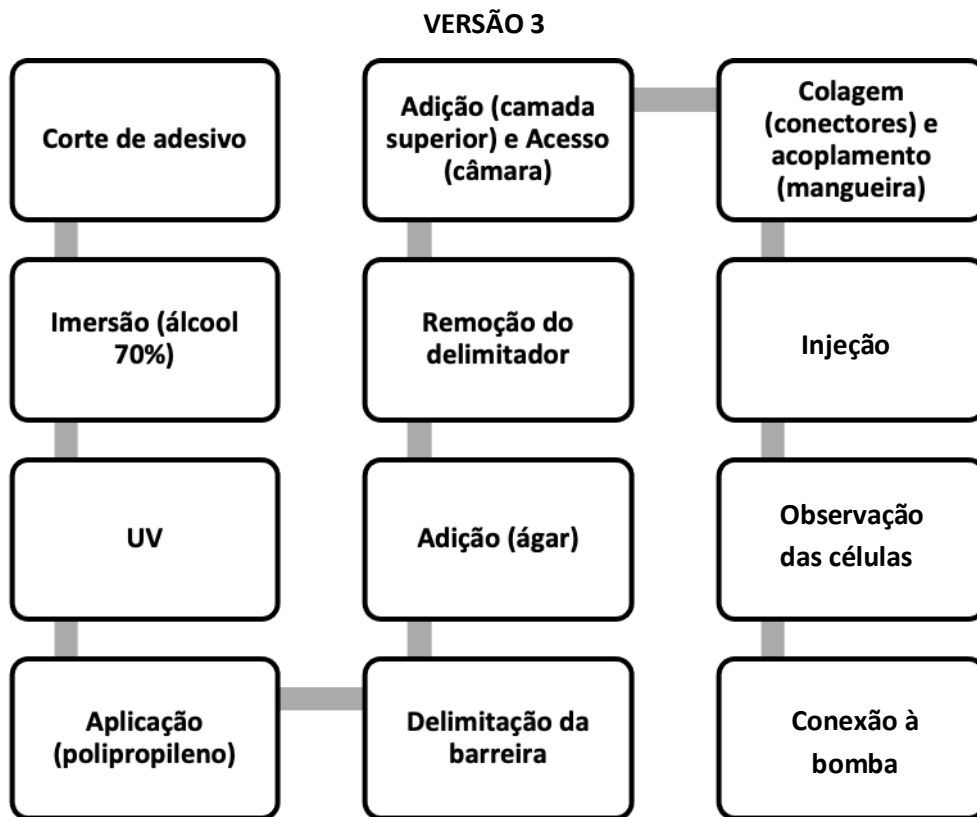


FIGURA 5

RESUMO

**DISPOSITIVO MICROCHIP PARA CULTURA CELULAR E MÉTODO DE
FABRICAÇÃO DO DISPOSITIVO**

A presente invenção se refere a um microdispositivo ou microchip para cultura celular que tem aplicação em mimetizações biológicas e ao método de fabricação do dispositivo. O dispositivo é capaz de ser uma plataforma para testes celulares dinâmicos, utilizando células humanas, imortalizadas ou não, passíveis de serem mantidas em cultura, e substituindo o uso de animais, a fim de obter respostas mais próximas das encontradas em seres humanos. O dispositivo microchip em questão pertence ao setor técnico da microfabricação e microfluídica dos órgãos-em-chips. O dispositivo apresenta-se como uma plataforma para testes biológicos que poderá ser aplicada em diversos campos da ciência biológica, biomédica, bioquímica, farmacêutica, cosmética e médica, como por exemplo, em ensaios toxicológicos, farmacológicos, imunológicos, metabólicos, entre outros.