

Avaliação da formação da barreira celular intestinal em *organ-on-a-chip* através do ensaio de permeabilidade celular

Mariana Lima Ferreira dos Santos*

Prof. Dr. Emanuel Carrilho

Instituto de Química de São Carlos (IQSC), Universidade de São Paulo

marianalifs@usp.br*

Objetivos

O presente trabalho tem como objetivo a avaliação da formação da barreira celular das linhagens imortalizadas de células intestinais (Caco-2) e células endoteliais de vasos sanguíneos (HUVEC) em um modelo de *intestine-on-a-chip* (IoC) com 5 dias de cultura, através do ensaio de permeabilidade aparente paracelular (P_{app}). Os IoCs são sistemas microfluídicos de simulação *in vitro* que visam mimetizar o funcionamento intestinal humano através de um cultivo dinâmico e da formação da barreira tecidual.

Métodos e Procedimentos

O dispositivo **intestine-on-a-chip (IoC)** foi construído utilizando camadas de PMMA e PET, unidas por adesivo dupla face, sendo esterilizado com etanol 70% e luz UV. O dispositivo é composto por cinco camadas principais, incluindo uma membrana porosa com poros de 0,4 ou 1,0 μm .

As células **Caco-2** e **HUVEC** foram cultivadas em meios **DMEM** e **RPMI**, respectivamente, com subcultivos semanais regulares, utilizando uma suspensão de 2×10^5 células/mL em frascos de cultura T25.

Para o **ensaio de permeabilidade**, com o objetivo de avaliar a formação da barreira celular, foram seguidos três passos principais: **(1) Teste de permeabilidade da membrana PET:** Avaliou-se a permeabilidade máxima das membranas PET com poros de 0,4 ou 1,0 μm ,

através de um experimento dinâmico com fluxo de 10 $\mu\text{L}/\text{min}$. No canal apical (doador), foi introduzida uma solução de 50 $\mu\text{Mol}/\text{L}$ de Vermelho de Fenol (VF), enquanto o canal basal (receptor) continha HBSS, durante um período de uma hora. **(2) Ensaio em Transwell:** Células **Caco-2** foram cultivadas no compartimento apical (superior) do sistema Transwell, e a permeabilidade foi monitorada com uma solução de 50 $\mu\text{Mol}/\text{L}$ de VF e HBSS no compartimento basal, durante 1h. **(3) Ensaio no IoC:** No dispositivo **IoC**, células **Caco-2** e **HUVEC** foram co-cultivadas nos compartimentos apical e basal, respectivamente. A permeabilidade do VF foi avaliada de maneira semelhante ao ensaio (1), após 5 dias de cultivo celular.

Resultados

Para avaliar a permeabilidade do dispositivo, foram realizados ensaios com membranas de PET de 0,4 μm e 1,0 μm . O Vermelho de Fenol (VF) foi utilizado como marcador de permeabilidade, e a curva de calibração apresentou um coeficiente de determinação (R^2) de 0,9996. A membrana de 1,0 μm demonstrou uma permeabilidade significativamente maior em comparação à de 0,4 μm , sendo, por isso, escolhida para os ensaios subsequentes.

Após 5 dias de cultivo celular, a formação da monocamada foi avaliada tanto no IoC quanto no modelo Transwell, utilizando ensaios de permeabilidade com VF. O IoC exibiu uma taxa

média de permeabilidade de $7,42 \times 10^{-6}$ cm/s, enquanto o modelo Transwell apresentou uma taxa de $3,58 \times 10^{-6}$ cm/s. A comparação dos resultados revelou uma redução significativa da permeabilidade na presença das células tanto no modelo dinâmico quanto estático, confirmando a formação adequada da monocamada celular no modelo *IoC*.

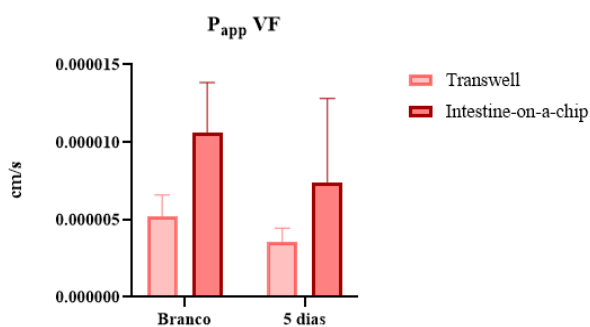


Figura 1: Comparação dos valores de P_{app} obtidos no *IoC* e no Transwell sem a presença de células (branco) e com a presença da barreira celular (Caco-2 + HUVEC) no quinto dia de cultura.

	Dados da Literatura	Dados obtidos neste trabalho	
Cultura Celular	Transwell (estática)	Transwell (estática)	<i>IoC</i> (dinâmica)
Tempo de Cultura	21 dias	5 dias	5 dias
Composto de baixa permeabilidade	Ranitidina	Vermelho de Fenol	Vermelho de Fenol
P_{app} (cm/s)	0,5 – 5,8 $\times 10^{-6}$ (Katneni, 2018)	3,58 $\times 10^{-6}$	7,42 $\times 10^{-6}$

Tabela 1. Comparação dos valores de P_{app} obtidos no experimento com o valor encontrado na literatura para composto de baixa permeabilidade, ranitidina.

Conclusões

O ensaio em branco foi de grande importância para identificar possíveis interferências da membrana na permeação das moléculas. Os resultados obtidos pelo experimento demonstram a formação efetiva da barreira celular intestinal no sistema *IoC* em comparação à literatura e ao ensaio em modelos estáticos, como evidenciado pelos ensaios de permeabilidade paracelular aparente. Além disso, esses dados evidenciam que o *Intestine-on-a-chip* pode aumentar a permeabilidade de VF pois está sob influência de um modelo dinâmico.

Agradecimentos

Agradeço ao CNPq pelo investimento realizado nessa pesquisa. Bem como ao Professor Doutor Emanuel Carrilho pela oportunidade de iniciação tecnológica e à aluna de doutorado, Amanda Maciel Lima, por todo o acompanhamento e cuidado durante o ano.

Referências

SMETANOVA, L.; STETINOVA, V.; KHOOVA, D.; KVETINA, J.; SMETANA, J.; SVOBODA, Z. **Caco-2 cells and Biopharmaceutics Classification System (BCS) for prediction of transepithelial transport of xenobiotics (model drug: caffeine).** *Neuro Endocrinology Letters**, v. 30, Suppl 1, p. 101-105, 2009. PMID: 20027153.

K. Kulthong, *et al.* **Transcriptome comparisons of in vitro intestinal epithelia grown under static and microfluidic gut-on-chip conditions with in vivo human epithelia** *Sci. Rep.*, 11 (1) (2021), p. 3234

Stephanie Y. Zhang, Whitney S.Y. Ong, Natalia Subelzu, John P. Gleeson **Validation of a Caco-2 microfluidic Chip model for predicting intestinal absorption of BCS Class I-IV drugs.** *International Journal of Pharmaceutics*. Volume 656, 10 May 2024, 124089. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2024.124089>.