PAULO AUGUSTO GOMES GARRIDO CARNEIRO LEÃO

Desenvolvimento de vaso sanguíneo biomimético em plataforma
microfluídica de poliéster-toner (PT)

Tese apresentada ao Instituto de Química de
São Carlos da Universidade de São Paulo para
a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Química Analítica e
Inorgânica.

Orientador: Prof. Dr. Emanuel Carrilho

São Carlos

2016

Exemplar revisado

O exemplar original encontra-se em
acervo reservado na Biblioteca do IQSC-USP

*Para minha esposa, meus filhos e meus
amados pais.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, meu criador e provedor de toda fonte de vida e inteligência.

À minha esposa, tão dedicada e amorosa, por ser meu porto seguro, meu apoio e minha fonte de energia incondicional.

Aos meus filhos, João, Gabriel e Sarah, pelos momentos de descontração, que sempre me auxiliaram a renovar meus ânimos, por serem minha fonte de perseverança e motivação.

Aos meus amados pais, por todo apoio, incentivo e por sempre me darem as condições para ir além.

Aos meus estimados sogro e sogra, que tanto me apoiam e me incentivam.

Aos meus cunhados e à minha querida cunhada, Lu.

Ao professor Emanuel Carrilho, exemplo de simplicidade, calma e profissionalismo. Por todas as oportunidades concedidas junto ao grupo BioMicS, pela paciência, pela confiança, pelas ideias e orientação.

Ao professor Luiz Henrique Mazo, por todo o auxílio concedido no início da pós-graduação. Por toda a preocupação com o meu bem-estar e sucesso.

Ao professor Albérico Borges Ferreira da Silva e à sua querida esposa Sandra Baiana, pela amizade, carinho e um convívio que deixou muitas saudades.

À amiga Dra. Ana Carolina Urbaczek, pela amizade, solicitude e por prontamente contribuir com seus conhecimentos ao longo do desenvolvimento deste trabalho.

Ao professor Danival Roberto Alves, exemplo de Mestre, caráter e dedicação, pelas oportunidades concedidas e conselhos que me moldaram.

Aos ex e atuais integrantes do grupo BioMicS: Dr. Renato Sousa Lima, pelas oportunidades concedidas no início do meu doutoramento, as quais muito contribuíram para o meu progresso científico. Dr. Thiago Segato, pelas ideias e orientações quanto ao uso da instrumentação disponível ao grupo. Dra. Alessandra Monteiro Maffei, pela amizade, discussões e colaborações científicas. Dr. Jonatan Ricardo Catai, pela amizade e por dividir comigo sua experiência profissional. Dras. Luciana Capelini, Juliana Alberice (Jú A), Fayene Ribeiro (Fay) e Patrícia Eugênio, pelas colaborações científicas e boas risadas. Weliton Batiston (Safadão), Juliane Borba (Jú B), Beatriz Miranda (Mira-miranda), Fabiana Marques (Amigordinha), Bruno Araújo, Cleyton Makara (Vina), Vinícius Ferreira, Carol Rafanhin, Júlia

Postigo, Thiago Mazzu, Amanda Imamura, Vitória Grando e Ana Paula, pelo convívio diário prazeroso e por tornarem o ambiente de trabalho um lugar amistoso. A todos, muito obrigado!

À Dra. Débora Terezia Balogh, ao Bruno Bassi Milan Torres, ao Marcos Felipe Bom Sampaio e ao Dr. Felipe J. Pavinatto, por disponibilizarem a infraestrutura do grupo de Polímeros do IFSC.

Ao Instituto de química de São Carlos (IQSC-USP) pela infraestrutura disponível. A todos professores, demais funcionários — em especial ao Dr. Márcio de Paula pela solicitude — e colaboradores, que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

“Por mais árduos e ásperos que sejam os caminhos até as estrelas, um dia lá chegaremos.”

Fernando Pessoa

RESUMO

O desenvolvimento de dispositivos microfluídicos biomiméticos, “órgãos-em-chip”, tem permitido melhores respostas em ensaios que carecem de uma correlação fisiológica mais próxima da *in vivo*. Explorando as tecnologias da microfluídica e microfabricação, esses dispositivos recapitulam aspectos específicos de estruturas e funções dos órgãos. Ainda, os avanços obtidos em culturas tridimensionais de células, modelos de matrizes extracelulares e tecnologias direcionadas às células tronco, têm consolidado os órgãos-em-chip como uma ferramenta fundamental para a compreensão de diversas respostas biológicas do corpo humano frente às aplicações biomédicas, farmacêuticas, químicas e ambientais. Com os avanços da nanotecnologia e ciência dos materiais, inúmeros progressos têm sido alcançados na farmácia e na medicina. Devido à redução da escala, propriedades que se diferenciam substancialmente daquelas encontradas na escala macro são obtidas. As nanopartículas de dióxido de titânio (NPs TiO₂) têm apresentado múltiplas aplicações na medicina e na indústria. Em vista disso, faz-se necessário a investigação dos efeitos tóxicos dessas nanopartículas, seja na saúde ou no meio ambiente. É bem documentado que as NPs TiO₂ podem chegar à corrente sanguínea e alcançar vários órgãos, causando reações inflamatórias e interações celulares que podem ser patogênicamente relevantes. Assim, o presente trabalho propõe o estudo dos efeitos das NPs TiO₂ em células endoteliais (HUVEC) cultivadas em um dispositivo microfluídico fabricado em poliéster-toner (PT), uma tecnologia simples que alia rapidez e baixo custo de produção. A viabilidade do uso dos *microchips* de PT foi avaliada por meio do teste MTT e produção de NO e verificou-se serem adequados para a cultura de células endoteliais. As células no sistema microfluídico foram expostas às NPs TiO₂, e os resultados comparados a um sistema estático (placas de cultura de células) submetido às condições semelhantes. Os sobrenadantes de ambos os sistemas foram utilizados para determinação da produção de VEGF-A. Ademais, foram avaliadas a produção de ânion superóxido e a indução de apoptose. Os resultados contribuem para o esclarecimento dos mecanismos de toxicidade das NPs TiO₂ e são correlacionados com as patologias que eventualmente estão associadas a esses efeitos. Por meio deste estudo, demonstrou-se o grande potencial dos *microchips* de PT para estudos em biologia celular, os quais podem fornecer a base para ensaios pré-clínicos com maior poder preditivo, alternativos ao uso de animais e cobaias na pesquisa científica.

ABSTRACT

The development of biomimetic microfluidic devices, "organ-on-chips", has allowed better responses in assays that need a closer *in vivo* physiological correlation. Exploring the technologies of microfluidics and microfabrication, these devices recapitulate specific aspects of structures and functions of the organs. In addition, the progress made in 3D cell cultures, extracellular matrix models, and stem cells technologies, have consolidated the organ-on-chips as a key tool for understanding various biological responses of the human body in face of biomedical, pharmaceutical, chemical, and environmental applications. With the advances in nanotechnology and materials science, much progress has been made in pharmacy and medicine. Due to the scale reduction, properties that differ substantially from those found on the macro scale are obtained. Titanium dioxide nanoparticles (TiO₂ NPs) have found many applications in medicine and industry. In view of this fact, it is necessary to investigate the toxic effects of nanoparticles, either on health or in the environment. It has been well documented that TiO₂ NPs can reach the bloodstream and affect various organs, causing inflammatory reactions and cellular interactions that can be pathogenetically relevant. Thus, this work proposes the study of the effects of TiO₂ NPs in endothelial cells (HUVEC) cultured in a microfluidic device made of polyester toner (PT), a simple technology that combines speed and low cost of production. The viability of the use of PT microchips was evaluated by MTT assay and production of NO and we found that it is suitable for culturing of endothelial cells. The HUVEC in the microfluidic system were exposed to TiO₂ NPs and the results compared to a static system (cell culture plates) subjected to similar conditions. Supernatants from both systems were used for determining the production of the VEGF-A. Furthermore, we have evaluated superoxide anion production and induction of apoptosis. The results contribute to clarify the mechanisms of toxicity of NPs TiO₂ and are correlated with the pathologies that eventually are associated with these effects. Through this study, we demonstrated the great potential of PT microchips for studies in cell biology, which may provide the basis for pre-clinical trials with greater predictive power, alternative to the use of animals in scientific research.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Geração de EROs induzidas por NPs TiO ₂ e seu mecanismo de citotoxicidade.	22
Figura 2 - Cinética de intoxicação por NPs TiO ₂ . A linha contínua representa o meio pelo qual as NPs TiO ₂ entram no corpo. A linha tracejada representa as reações bioquímicas estimuladas pelas NPs TiO ₂ que danificam várias partes do corpo.	24
Figura 3 – Imagens de perfilometria do microcanal impresso em toner (A) e do intermediário recortado em filme de poliéster (B).	33
Figura 4 - Desenho, dimensões e estrutura de montagem do <i>microchip</i> de PT. Tanto o substrato superior (TL) e inferior (BL) são produzidos a partir da impressão direta a laser, em que uma camada de toner delimita um canal de 6 µm de altura, 2,0 cm de comprimento, 0,2 cm de largura e dois círculos de 0,3 cm de diâmetro em cada extremidade. Para acesso ao microcanal, a camada superior (TL) dispõe de acessos, sendo um conector do tipo fêmea adicionado para facilitar o encaixe de mangueiras de silicone para a operação fluídica do <i>microchip</i> . Uma camada intermediária adicional de poliéster (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. 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 faz as vezes de promover a adesão entre as camadas constituintes do <i>microchip</i> , por meio da fusão do toner durante a etapa de laminação a quente. Devido a essa etapa, a altura final do microcanal é de aproximadamente 103 µm, resultado da deformação da camada de toner.	33
Figura 5 - Sequência de imagens da perfusão de corante no <i>microchip</i> de PT por capilaridade. Dimensões do microcanal: 2 cm de comprimento x 2 mm de largura x 103 µm de altura. O tempo total para o corante fluir através do microcanal foi de 31 s.	34
Figura 6 – Representação esquemática da cultura de células sob perfusão.	35
Figura 7 - Análise da citotoxicidade direta e indireta dos materiais utilizados para a confecção do <i>microchip</i> pelo teste MTT. Controle negativo: meio de cultura. Controle positivo: SDS 1%. Concentração de células por poço: 5 x 10 ⁵ . Condições da cultura: 24 h; 37 °C e 5% de CO ₂ . Resultados expressos como viabilidade média ± desvio padrão (barras de erro). Análises estatísticas foram realizadas utilizando-se ANOVA de um fator e teste bilateral de Dunnett para comparações com o controle negativo. *p < 0,05 com respeito ao controle negativo.	46
Figura 8 - Efeito dos materiais componentes do <i>microchip</i> na produção de óxido nítrico (NO) em HUVEC. Controle negativo: meio de cultura. Controle positivo: TNF-α 10 ng mL ⁻¹ . Concentração de células por poço: 5 x 10 ⁵ . Condições da cultura: 24 h; 37 °C e 5% de CO ₂	47
Figura 9 - Micrografias do <i>microchip</i> antes e após a injeção das células. (A) <i>Microchip</i> de PT, sem tratamento e vazio – pontos escuros na superfície do poliéster são provenientes do seu processo de fabricação. (B) Células (círculos com o centro claro) no interior do <i>microchip</i> de PT (não tratado) logo após a injeção. Concentração celular: 5 x 10 ⁶ células HUVEC/mL. Escala: 100 µm.	48
Figura 10 - Micrografia das células no interior do <i>microchip</i> PT (não-tratado). (A) <i>microchip</i> dinâmico: após perfusão por 96 h a uma vazão de 2 µL min ⁻¹ . (B) <i>microchip</i> estático: após permanecer por 96 h na estufa a 37 °C e 5% de CO ₂ . Concentração celular: 5 x 10 ⁶ HUVEC/mL. Escala: 100 µm.	49
Figura 11 - Avaliação morfológica das células HUVEC. (A) 24 h em garrafa de poliestireno. (B) 24 h no interior do <i>microchip</i> de PT (não-tratado). Escala: 100 µm.	49

- Figura 12 - Células no interior do *microchip* de PT (não-tratado) coradas com azul de tripan 0,01%. **(A)** Células perfundidas por 96 h, refringentes. **(B)** Células contidas no interior do *microchip* estático (células com o interior cinza) após 96 h. Escala: 100 μm 51
- Figura 13 - Células provenientes do *microchip* (não-tratado) perfundido por 96 h e transferidas para uma placa de cultura celular de poliestireno com 24 poços. **t 0**: células na placa imediatamente após abertura do *microchip*. Tempos 24 (**t 24**), 48 (**t 48**), 72 (**t 72**) e 96 h (**t 96**) após a deposição das células em placa. Escala: 100 μm 52
- Figura 14 - Células provenientes do *microchip* estático (não-tratado) cultivadas por 96 h e transferidas para uma placa de cultura de células de poliestireno com 24 poços. **t 0**: células na placa imediatamente após abertura do *microchip*. Tempos 24 (**t 24**), 48 (**t 48**), 72 (**t 72**) e 96 h (**t 96**) após a deposição das células na placa. Escala: 100 μm 53
- Figura 15 - Teste de MTT para avaliação da viabilidade das células HUVEC após vários tempos de permanência no *microchip* de PT (não-tratado) com e sem perfusão. Resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão de células viáveis (%) 54
- Figura 16 - Células HUVEC no interior do *microchip* de PT (não-tratado) estático. **(A)** *Microchip* estático com 5×10^6 céls/mL – tempo zero. **(B)** *Microchip* estático com 5×10^6 céls/mL – tempo 24 h. **(C)** *Microchip* estático com 1×10^7 céls/mL – tempo zero. **(D)** *Microchip* estático com 1×10^7 céls/mL – tempo 24 h. Escala: 100 μm 55
- Figura 17 - HUVEC no interior do *microchip* de PT (não-tratado) fluídico. **(A)** *Microchip* fluídico com 5×10^6 céls/mL – tempo zero. **(B)** *Microchip* fluídico com 5×10^6 céls/mL – tempo 24 h. **(C)** *Microchip* fluídico com 1×10^7 céls/mL – tempo zero. **(D)** *Microchip* fluídico com 1×10^7 céls/mL – tempo 24 h. Escala: 100 μm 56
- Figura 18 - HUVEC em placa de poliestireno. **(A)** Poço com 5×10^6 céls/mL – tempo zero. **(B)** Poço com 5×10^6 céls/mL – tempo 24 h. **(C)** Poço com 1×10^7 céls/mL – tempo zero. **(D)** Poço com 1×10^7 céls/mL – tempo 24 h. Escala: 100 μm 57
- Figura 19 - Ensaio de detecção da produção de VEGF-A pelas células HUVEC no sobrenadante de perfusão do *microchip* (não-tratado) e em placa de poliestireno. Células injetadas no *microchip* e adicionadas aos orifícios da placa: 5×10^6 céls/mL. Resultados apresentados como média $\pm$ desvio padrão 58
- Figura 20 - Imagens de AFM (50 x 50 μm) mostrando diferenças na topografia dos filmes de poliéster sem tratamento **(A)** e tratado com plasma de oxigênio **(B)**. 59
- Figura 21 – Avaliação da energia livre de superfície dos filmes de poliéster nativo e tratado com plasma RF O_2 . O filme de poliéster nativo apresenta uma componente polar de 18,4 (mJ m^{-2}), ao passo que essa é elevada para 60,9 (mJ m^{-2}) após a exposição do filme ao plasma. γ_s : Energia livre de superfície. γ_s^d : Componente dispersiva. γ_s^p : componente polar. O erro estimado para as medidas de ângulo de contato foi de $\pm 3^\circ$ para 3 medidas independentes. 60
- Figura 22 - *Microchip* de PT, tratado com plasma de oxigênio, fluídico (perfundido com meio de cultura RPMI suplementado com 20% de SFB e adicionado de mix de antibióticos e antifúngicos). Tempo zero (**t 0**). 24 (**t 24**), 48 (**t 48**), 72 (**t 72**), 96 (**t 96**) e 120 (**t 120**) horas de perfusão do *microchip*. Concentração celular: 10^7 céls/mL. Escala: 100 μm . As setas indicam células em processo de alongamento ou já alongadas..... 61
- Figura 23 - *Microchip* de PT, tratado com plasma de oxigênio, estático. Tempo zero (**t 0**) e 120 (**t 120**) horas de perfusão do *microchip*. Concentração celular: 10^7 céls/mL. Escala: 100 μm 61
- Figura 24 - *Microchip* de PT tratado com plasma de oxigênio e fibronectina ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$). Tempo zero (**t 0**). 6 h após injeção das células no *microchip* (**t 6**). (**t 24**) 24 h e (**t 120**) 120 h de perfusão de meio de cultura por bomba de seringa a uma vazão de $2 \mu\text{L min}^{-1}$. Escala: 100 μm 63

- Figura 25 - *Microchip* de PT tratado com plasma de oxigênio e fibronectina ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$), não perfundido com meio de cultura e mantido em estufa a 37°C e 5% de CO_2 por 24 h. Escala: $100 \mu\text{m}$ 64
- Figura 26 - *Microchip* de PT tratado com plasma de oxigênio e fibronectina ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) e injetado com células em meio RPMI suplementado e adicionado de 1 mmol L^{-1} de MgCl_2 e 1 mol L^{-1} de MnCl_2 . Tempo zero (**t 0**). 6 h após injeção das células no *microchip* (**t 6**). 24 h (**t 24**) de perfusão com bomba de seringa a uma vazão de $2 \mu\text{L min}^{-1}$. Escala: $100 \mu\text{m}$ 65
- Figura 27 - *Microchip* de PT tratado com plasma de oxigênio e fibronectina ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) e injetado com células em meio RPMI suplementado e adicionado de 1 mmol L^{-1} de MgCl_2 e 1 mol L^{-1} de MnCl_2 . 24 h (**t 24**) de perfusão com bomba de seringa a uma vazão de $2 \mu\text{L min}^{-1}$. (**A**) Escala: $100 \mu\text{m}$. (**B**) aumento de 40x 66
- Figura 28 - Teste de MTT para avaliação da viabilidade das células HUVEC após vários tempos de permanência no *microchip* de PT (tratados com plasma de oxigênio e fibronectina) com ou sem perfusão. Controle negativo: meio RPMI completo. Controle positivo: SDS 1%. Resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão de células..... 67
- Figura 29 - Níveis de produção de VEGF-A pelas células HUVEC nos sobrenadantes de perfusão do *microchip* sob diferentes tratamentos e no sobrenadante de cultura de células em placa de poliestireno. Concentração celular no *microchip* e na placa: 1×10^7 céls/mL. Resultados apresentados como média $\pm$ desvio padrão. Testes de ANOVA e Tukey para comparações múltiplas. Diferenças estatisticamente significativas são representadas por letras sobre as barras. * $p < 0,05$ comparado com o *microchip* não-tratado..... 68
- Figura 30 - Teste de MTT para avaliação da viabilidade das HUVEC após exposição a diferentes concentrações de NPs TiO_2 (100, 50, 25, 20, 10, $5 \mu\text{g mL}^{-1}$). C- (controle negativo: meio de cultura). C+ (controle positivo: SDS 1%). Células por orifício da placa: 5×10^5 . Condições: 24 h, 37°C e 5% de CO_2 . Resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão de células viáveis..... 69
- Figura 31 - Perfil protéico do lisado de células HUVEC cultivadas no *microchip* e na placa e tratadas com NPs TiO_2 . Canaletas 1, 3, 5, 7, 9: células cultivadas no *microchip*. Canaletas 2, 4, 6, 8, 10: células cultivadas na placa. 9-10: controle sem tratamento com NPs TiO_2 70
- Figura 32 - Interior do canal dos *microchips* de PT preenchidos com células HUVEC expostas às várias concentrações de NPs TiO_2 e perfundidas com bomba de seringa a uma vazão de $2 \mu\text{L min}^{-1}$ por 24 h. **A**: células HUVEC não expostas às NPs TiO_2 . **B**: HUVEC expostas à $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de NPs TiO_2 . **C**: HUVEC expostas à $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ de NPs TiO_2 . **D**: HUVEC expostas à $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ de NPs TiO_2 . **E**: HUVEC expostas à $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ de NPs TiO_2 . **F**: HUVEC expostas à $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ de NPs TiO_2 . **G**: HUVEC expostas à $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ de NPs TiO_2 . Aumento de 40x..... 71
- Figura 33 - Concentração de VEGF-A no sobrenadante das células HUVEC submetidas a diversas concentrações de NPs TiO_2 (em $\mu\text{g mL}^{-1}$) no *microchip* de PT e em placa de poliestireno. C-: células não submetidas ao contato com NPs TiO_2 . C+: células submetidas ao contato com $\text{TNF-}\alpha$ (10 ng mL^{-1}). Células injetadas no *microchip* e adicionadas aos orifícios da placa: 5×10^6 céls/mL. Resultados apresentados como média $\pm$ desvio padrão..... 72
- Figura 34 - Células HUVEC cultivadas em lâminas de 8 cavidades (controle estático) coradas com corantes fluorescentes para avaliação da produção espontânea de ânion superóxido. **A**: controle positivo (células estimuladas com $\text{TNF-}\alpha$ por 24 h) coradas com DHE. **B**: controle positivo (células estimuladas com $\text{TNF-}\alpha$ por 24 h) coradas com MitoSox. **C**: controle negativo (células expostas somente ao meio de cultura por 24 h) coradas com DHE. **D**: controle negativo (células expostas somente ao meio de cultura por 24 h) coradas com MitoSox. **E**: controle negativo (células expostas à 0,1% de DMSO – concentração de diluição dos corantes, por 24 h) coradas com DHE. **F**: controle negativo (células expostas à 0,1% de DMSO, por 24 h) coradas com MitoSox. Núcleos corados com DAPI (azul). Aumento 200 x 74

Figura 35 - Células HUVEC cultivadas em lâminas de 8 cavidades (controle estático) coradas com corantes fluorescentes para avaliação da produção de ânion superóxido mediante exposição às NPs TiO₂. **A:** HUVEC expostas à 5 µg mL⁻¹ de NPs TiO₂ por 24 h e coradas com DHE. **B:** HUVEC expostas à 5 µg mL⁻¹ de NPs TiO₂ por 24 h e coradas com MitoSox. **C:** HUVEC expostas à 10 µg mL⁻¹ de NPs TiO₂ por 24 h e coradas com DHE. **D:** HUVEC expostas à 10 µg mL⁻¹ de NPs TiO₂ por 24 h e coradas com MitoSox. **E:** HUVEC expostas à 20 µg mL⁻¹ de NPs TiO₂ por 24 h e coradas com DHE. **F:** HUVEC expostas à 20 µg mL⁻¹ de NPs TiO₂ por 24 h e coradas com MitoSox. **G:** HUVEC expostas à 25 µg mL⁻¹ de NPs TiO₂ por 24 h e coradas com DHE. **H:** HUVEC expostas à 25 µg mL⁻¹ de NPs TiO₂ por 24 h e coradas com MitoSox. **I:** HUVEC expostas à 50 µg mL⁻¹ de NPs TiO₂ por 24 h e coradas com DHE. **J:** HUVEC expostas à 50 µg mL⁻¹ de NPs TiO₂ por 24 h e coradas com MitoSox. **K:** HUVEC expostas à 100 µg mL⁻¹ de NPs TiO₂ por 24 h e coradas com DHE. **L:** HUVEC expostas à 100 µg mL⁻¹ de NPs TiO₂ por 24 h e coradas com MitoSox. Núcleos corados com DAPI (azul). Aumento 200x..... 76

Figura 36 - Células HUVEC cultivadas em *microchips* de PT (controle dinâmico) coradas com corantes fluorescentes para avaliação da produção de ânion superóxido mediante exposição às NPs TiO₂. **A:** controle negativo: HUVEC expostas ao meio de cultura por 24 h coradas com DHE. **B:** controle negativo: HUVEC expostas ao meio de cultura por 24 h coradas com MitoSox. **C:** HUVEC expostas à 5 µg mL⁻¹ de NPs TiO₂ por 24 h e coradas com DHE. **D:** HUVEC expostas à 5 µg mL⁻¹ de NPs TiO₂ por 24 h e coradas com MitoSox. **E:** HUVEC expostas à 10 µg mL⁻¹ de NPs TiO₂ por 24 h e coradas com DHE. **F:** HUVEC expostas à 10 µg mL⁻¹ de NPs TiO₂ por 24 h e coradas com MitoSox. **G:** HUVEC expostas à 20 µg mL⁻¹ de NPs TiO₂ por 24 h e coradas com DHE. **H:** HUVEC expostas à 20 µg mL⁻¹ de NPs TiO₂ por 24 h e coradas com MitoSox. **I:** HUVEC expostas à 25 µg mL⁻¹ de NPs TiO₂ por 24 h e coradas com DHE. **J:** HUVEC expostas à 25 µg mL⁻¹ de NPs TiO₂ por 24 h e coradas com MitoSox. **K:** HUVEC expostas à 50 µg mL⁻¹ de NPs TiO₂ por 24 h e coradas com DHE. **L:** HUVEC expostas à 50 µg mL⁻¹ de NPs TiO₂ por 24 h e coradas com MitoSox. **M:** HUVEC expostas à 100 µg mL⁻¹ de NPs TiO₂ por 24 h e coradas com DHE. **N:** HUVEC expostas à 100 µg mL⁻¹ de NPs TiO₂ por 24 h e coradas com MitoSox. Núcleos corados com DAPI (azul). Aumento 200x. 77

Figura 37 - Células HUVEC em lâmina (sistema estático) após exposição de 24 h a várias concentrações de NPs TiO₂ coradas com laranja de acridina e brometo de etídio. **A:** controle negativo (células não expostas às NPs TiO₂). **B:** controle positivo (células expostas ao TNF-α). **C:** HUVEC expostas à 5 µg mL⁻¹ de NPs TiO₂. **D:** HUVEC expostas à 10 µg mL⁻¹ de NPs TiO₂. **E:** HUVEC expostas à 20 µg mL⁻¹ de NPs TiO₂. **F:** HUVEC expostas à 25 µg mL⁻¹ de NPs TiO₂. **G:** HUVEC expostas à 50 µg mL⁻¹ de NPs TiO₂. **H:** HUVEC expostas à 100 µg mL⁻¹ de NPs TiO₂. Aumento de 100x..... 79

Figura 38 - Porcentagem de células HUVEC vivas, em apoptose (precoce e tardia) e em necrose, submetidas às concentrações de NPs TiO₂ testadas na lâmina e coradas com laranja de acridina e brometo de etídio. **A:** controle negativo (células não expostas às NPs TiO₂). **B:** controle positivo (células expostas ao TNF-α). **C:** HUVEC expostas à 5 µg mL⁻¹ de NPs TiO₂. **D:** HUVEC expostas à 10 µg mL⁻¹ de NPs TiO₂. **E:** HUVEC expostas à 20 µg mL⁻¹ de NPs TiO₂. **F:** HUVEC expostas à 25 µg mL⁻¹ de NPs TiO₂. **G:** HUVEC expostas à 50 µg mL⁻¹ de NPs TiO₂. **H:** HUVEC expostas à 100 µg mL⁻¹ de NPs TiO₂. 80

Figura 39 - Células HUVEC em *microchips* (sistema dinâmico) após exposição de 24 h a várias concentrações de NPs TiO₂ coradas com laranja de acridina e brometo de etídio. **A:** controle negativo (células não expostas às NPs TiO₂). **B:** controle positivo (células expostas ao TNF-α). **C:** HUVEC expostas à 5 µg mL⁻¹ de NPs TiO₂. **D:** HUVEC expostas à 10 µg mL⁻¹ de NPs TiO₂. **E:** HUVEC expostas à 20 µg mL⁻¹ de NPs TiO₂. **F:** HUVEC expostas à 25 µg mL⁻¹ de NPs TiO₂. **G:** HUVEC expostas à 50 µg mL⁻¹ de NPs TiO₂. **H:** HUVEC expostas à 100 µg mL⁻¹ de NPs TiO₂. Aumento de 100x 83

Figura 40 - Porcentagem de HUVEC vivas, em apoptose e em necrose, submetidas às concentrações de NPs TiO₂ testadas no *microchip* por 24 h e coradas com laranja de acridina e brometo de etídio. **A:** controle negativo (células não expostas às NPs TiO₂). **B:** controle positivo (células expostas ao TNF-α). **C:** HUVEC expostas à 5 µg mL⁻¹ de NPs TiO₂. **D:** HUVEC expostas à 10 µg mL⁻¹ de NPs TiO₂. **E:** HUVEC expostas à 20 µg mL⁻¹ de NPs TiO₂. **F:** HUVEC expostas à 25 µg mL⁻¹ de NPs TiO₂. **G:** HUVEC expostas à 50 µg mL⁻¹ de NPs TiO₂. **H:** HUVEC expostas à 100 µg mL⁻¹ de NPs TiO₂. 84

Figura 41 - HUVEC cultivadas em lâmina (sistema estático) após exposição a várias concentrações de NPs TiO₂ durante 24 h e coradas com YO-PRO-1 e IP. **A:** controle negativo (células não expostas às NPs TiO₂). **B:** controle positivo (células expostas ao TNF- α). **C:** HUVEC expostas à 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de NPs TiO₂. **D:** HUVEC expostas à 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de NPs TiO₂. **E:** HUVEC expostas à 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de NPs TiO₂. **F:** HUVEC expostas à 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de NPs TiO₂. **G:** HUVEC expostas à 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de NPs TiO₂. **H:** HUVEC expostas à 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de NPs TiO₂. Núcleos azuis corados com DAPI. Células apoptóticas coradas em verde. Células necróticas coradas em vermelho. Aumento de 40x. 86

Figura 42 - Células HUVEC no *microchip* de PT (sistema dinâmico) após exposição por 24 h a várias concentrações de NPs TiO₂ coradas com YO-PRO-1 e IP. **A:** controle negativo (células não expostas às NPs TiO₂). **B:** controle positivo (células expostas ao TNF- α). **C:** HUVEC expostas à 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de NPs TiO₂. **D:** HUVEC expostas à 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de NPs TiO₂. **E:** HUVEC expostas à 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de NPs TiO₂. **F:** HUVEC expostas à 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de NPs TiO₂. **G:** HUVEC expostas à 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de NPs TiO₂. **H:** HUVEC expostas à 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de NPs TiO₂. Núcleos azuis corados com DAPI. Células apoptóticas coradas em verde. Células necróticas coradas em vermelho. Aumento de 40x. 87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Componentes de tensão interfacial dos líquidos.	31
---	----

SUMÁRIO

Resumo.....	7
Abstract	8
Lista de Figuras	9
Lista de tabelas	14
Sumário	15
1 Introdução	18
2 Objetivos gerais	26
2.1 Objetivos específicos	26
3 MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1 Preparo do meio RPMI (meio <i>Roswell Park Memorial Institute</i>) - Solução estoque.....	27
3.2 Meio de cultura para uso — meio completo	27
3.3 Cultura celular	27
3.4 Avaliação da citotoxicidade dos componentes do <i>microchip</i>	28
3.5 Microfabricação do dispositivo de poliéster-toner	30
3.6 Caracterização da topografia dos filmes de poliéster: Energia livre de superfície e Análises por microscopia de força atômica (AFM)	31
3.7 Fabricação do <i>microchip</i> de PT	32
3.8 Estudo da fluídica e da vazão no <i>microchip</i> de PT.....	34
3.9 Modificação biológica – Adsorção de proteínas	35
3.10 Estabelecimento da cultura de células no <i>microchip</i> de PT	36
3.11 Avaliação da viabilidade, morfologia, adesão e confluência.....	37
3.12 Determinação de VEGF-A por teste imunoenzimático	38
3.13 Ensaios com nanopartículas de dióxido de titânio (NPs TiO ₂).....	38
3.14 Determinação de VEGF-A por ensaio imunoenzimático (ELISA)	40
3.15 Avaliação da produção de ânion superóxido <i>in situ</i>	40
3.16 Avaliação do processo de morte celular <i>in situ</i> com laranja de acridina e brometo de etídio.....	41
3.17 Avaliação do processo de morte celular <i>in situ</i> com YO-PRO-1 e Iodeto de Propídio .	43
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
4.1 Ensaio para avaliação da toxicidade dos materiais componentes do <i>microchip</i>	45
4.2 Cultura de células no <i>microchip</i> de PT microfluídico	47
4.3 Comparação das diferenças morfológicas	49

4.4 Avaliação da viabilidade celular no <i>microchip</i>	50
4.5 Observação da confluência	54
4.6 Determinação de VEGF-A por ensaio imunoenzimático	58
4.7 Tratamento da superfície dos filmes de poliéster.....	59
4.8 Perfusão dos <i>microchips</i> de PT com diversas concentrações de NPs TiO ₂	70
4.9 Determinação de VEGF-A por ensaio imunoenzimático (ELISA)	72
4.10 Avaliação da produção de ânion superóxido <i>in situ</i>	73
4.11 Avaliação do processo de morte celular <i>in situ</i> com Laranja de Acridina e Brometo de Etídio.....	78
4.12 Avaliação do processo de morte celular <i>in situ</i> com YO-PRO-1 e Iodeto de Propídio (IP)	85
5 Conclusões.....	89
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90

1 INTRODUÇÃO

Ao longo dos últimos 20 anos, a necessidade de abordagens multissetoriais e integradas para o estudo de patologias tem sido enfatizada. A tecnologia aplicada ao estudo de tecidos proporcionou o desenvolvimento de modelos de cultura de células em 2D (monocamadas de tipos celulares únicos) que levaram a novas perspectivas sobre o controle biológico, mas ainda hoje, esses não são ideais para mimetizar variações órgão-específicas que ocorrem no microambiente *in vivo*. Em vista disso, muitos estudos necessitam utilizar modelos animais, que representam altos custos e são eticamente questionáveis. Além disso, muitos desses modelos não são aplicáveis para prever e reproduzir respostas humanas (1,2). Por conseguinte, tais limitações têm impulsionado a ciência para o desenvolvimento de modelos alternativos *in vitro* que melhor mimetizem as complexas estruturas e funcionalidades dos órgãos utilizando células específicas e suas patologias associadas.

O desenvolvimento de modelos biologicamente relevantes de tecidos e órgãos humanos é um passo importante para a descoberta de novos medicamentos. O uso de microssistemas ou *microchips* denominados de órgãos em chip, permite simular *in vitro* condições fisiopatológicas semelhantes às aquelas observadas *in vivo*, portanto, são ferramentas viáveis para estudos biológicos fundamentais. Além de ser considerado um método alternativo ao uso de animais na pesquisa, a principal vantagem dessa ferramenta é a fácil manipulação das células e o controle preciso do microambiente celular. *In vivo*, as células estão expostas aos vários sinais do microambiente e sistêmico, a saber: *i*) comunicações intercelulares; *ii*) interações tecido-tecido; e *iii*) interações célula-matriz extracelular (3). No entanto, culturas convencionais de células em 2D não levam em consideração esses e outros fatores, e as análises tornam-se limitadas (4,5).

As novas possibilidades que emergiram da convergência da microengenharia com a tecnologia de microfluídos e a biologia celular levaram ao desenvolvimento dos órgãos em chip (6–8). Esses reconstituem os arranjos estruturais dos tecidos e a complexidade funcional dos órgãos, usando cultura de células em dispositivos microfluídicos com significativa relevância para a microarquitetura e para o microambiente, que são capazes de influenciar nas respostas celulares (9). Assim, os órgãos em chip permitem o estudo de diversos processos biológicos (fisiológicos ou patológicos) *in vitro*, que anteriormente não eram possíveis em

sistemas convencionais de cultura de células ou em modelos animais, por possibilitar a recriação de ambientes específicos, a partir de uma abordagem reducionista (10). A partir dessas novas tecnologias, diversos modelos de órgãos em chip foram criados para muitas finalidades, mimetizando órgãos como fígado, pulmão, rim, intestino, córnea, redes neuronais, ossos, coração, cérebro, vasos sanguíneos, músculos, medula óssea, entre outros (2,9,11,12).

Esses modelos de órgãos em chip, bem como ocorre nos órgãos *in vivo*, possibilitam interfaces tecido/tecido, permitindo a interação desses tecidos por meio de comunicações químicas, de nutrientes, hormônios, metabólitos, citocinas, sinais físicos e de forças fluídicas fisiológicas, que no microambiente *in vivo* são essenciais para a sobrevivência, crescimento, resposta e funcionalidade daquele tecido, representando, assim, com maior precisão o que ocorre originalmente no órgão *in vivo* (3). Logo, o entendimento da fisiopatogênese humana requer a investigação de como células e tecidos executam suas funções no contexto de um órgão como um todo (3,5).

Melhorar a eficácia das previsões pré-clínicas de respostas humanas a drogas é fundamental para reduzir falhas dispendiosas em triagens clínicas (13). Em face disso, os órgãos em chip podem fornecer a base para os ensaios pré-clínicos com maior poder preditivo (13). Ademais, a análise da citotoxicidade de nano-materiais e a descoberta de compostos com potencial para serem utilizados como fármacos têm sido frequentemente realizadas em órgãos em chip, confirmando sua viabilidade em reduzir a utilização de cobaias animais, seja na academia ou indústria (14).

Um dos grandes gargalos concernentes à fabricação dos órgãos em chip reside nos altos custos de implementação e manutenção de infraestrutura adequada, fato que limita a difusão dessa tecnologia para além de laboratórios especializados em microfabricação (15). Visando atender a demanda da comunidade científica por dispositivos microfluídicos, Duffy e colaboradores (16), foram pioneiros ao descreverem um procedimento para fabricar sistemas microfluídicos fechados usando um polímero elastomérico que, futuramente, se tornaria o mais utilizado para a fabricação de dispositivos biomiméticos, o poli(dimetilsiloxano) (PDMS) (17,18). O PDMS, uma borracha de silicone biocompatível, reúne diversas características atrativas, tais como: *i)* inércia química; *ii)* baixo custo; *iii)* fácil manuseio; *iv)* estabilidade em uma ampla faixa de temperaturas (de -50 a 200 °C); *v)* transparência óptica; *vi)* permeabilidade

a gases, viabilizando a trocas gasosas e comunicação celular por meio de sinais químicos lançados no meio de cultura (16,19,20). Além disso, o PDMS pode ser facilmente integrado a outros materiais, sendo o mais comum o vidro (19). A técnica permitiu a produção de microdispositivos em menos de 24 horas, representando uma redução significativa no tempo de fabricação em relação à produção dos *microchips* de vidro (16). Técnicas de microfabricação (fotolitografia, moldagem por réplica e impressão direta) e a tecnologia de microfluídos têm possibilitado o desenvolvimento de dispositivos que permitem um controle preciso da dinâmica do fluxo e pressão de fluidos, do estado da célula, posição, função e organização tecidual em culturas altamente estruturadas(4,20,21). Isso possibilita a criação de um microambiente na cultura de células, que considera gradientes químicos e sinais mecânicos dinâmicos, capazes de induzir as células a expressarem respostas mais próximas da realidade *in vivo* (22).

Na busca por materiais alternativos e métodos mais simples de microfabricação, Do Lago e colaboradores (23) relataram um outro processo alternativo, ainda mais simplificado e de menor custo para produção de dispositivos microfluídicos, emergindo, assim, os *microchips* de poliéster-toner (PT). O método propõe a utilização de uma camada de toner depositada em um filme de poliéster para a definição dos canais microfluídicos e, adicionalmente, também servir como um intermediário adesivo para vedação do dispositivo, após uma etapa de laminação a quente. Lançando mão dessa técnica, diversos tipos de *microchips* de PT com as mais distintas aplicações puderam ser concebidos, como por exemplo: *microchips* para análises de DNA (extração, reações de PCR e eletroforese), análises enzimáticas para detecções colorimétricas de proteínas, glicose e colesterol em amostras de soro e análises farmacêuticas(15,17,18).

Os *microchips* de PT são uma plataforma promissora para direcionar a tecnologia de microfluídos a laboratórios que não dispõem de facilidades dedicadas à microfabricação. Vantagens quanto à simplicidade de fabricação dos dispositivos, além da rapidez e baixo custo — tanto da matéria-prima quanto da instrumentação para o processo de microfabricação — figuram como os principais atrativos para o uso desses dispositivos.

Os avanços da ciência de materiais, em especial a exploração das propriedades das nano-partículas, possibilitaram o desenvolvimento de novos produtos para diversos fins. No início do século 20, surgiram produtos contendo NPs TiO_2 . As NPs TiO_2 são amplamente

utilizadas em produtos de uso diário, a listar: *i)* protetores solares; *ii)* cosméticos; *iii)* pasta de dentes (24,25). Ainda, as NPs TiO₂ são utilizadas na medicina como fotossensibilizadores na terapia fotodinâmica (26). NPs TiO₂ também são utilizadas como plataformas de suporte e estratégias de segmentação no contexto de aplicações clínicas, para a liberação de fármacos e em terapias fototérmicas para câncer (24). Para o campo industrial, as NPs TiO₂ agregam vantagens significativas, incluindo: *i)* elevada estabilidade, *ii)* resistência à corrosão e *iii)* boas propriedades fotocatalíticas. Logo, as NPs TiO₂ estão cada vez mais substituindo os seus homólogos maiores (24).

Dada a utilização generalizada das NPs TiO₂, a sua segurança ganhou ainda mais atenção: ainda que as NPs TiO₂ sejam consideradas um material seguro, existe a preocupação com os seus eventuais efeitos na saúde e no meio ambiente. As reações celulares às NPs podem resultar na modificação de funções dessas, tais como: repressão ou ativação de genes e ativação de organelas específicas. Assim, devido ao seu potencial tóxico, as NPs TiO₂ são classificadas pela *International Agency for Research on Cancer*, como possivelmente carcinogênico para humanos, quando inalado (25).

Estudos demonstraram que a exposição às NPs TiO₂ resulta em estresse oxidativo celular e na produção de espécies reativas de oxigênio (RO_s), desencadeando efeitos citotóxicos pró-oxidantes e antioxidantes. Essas descobertas mostram que NPs TiO₂ induzem à geração de enzimas antioxidantes pelas células, danos em proteínas, na membrana celular e no DNA, formação de micronúcleo e liberação de citocinas pró-inflamatórias (27). A Figura 1 ilustra a produção de EROs induzida pelas NPs TiO₂.

Figura 1 - Geração de EROs induzidas por NPs TiO₂ e seu mecanismo de citotoxicidade.

Fonte: Adaptação de Carneiro Leão (2016) a partir de Fard, Jafari, Eghbal, A Review of Molecular Mechanisms Involved in Toxicity of Nanoparticles. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, v. 5, n. 4, p. 447-454, 2015.

Estudos recentes relatam que a absorção de NPs TiO₂ pode ocorrer por meio de múltiplas rotas, incluindo inalação, ingestão e transdérmica. As NPs TiO₂ circulam através da corrente sanguínea ou sistema linfático, e, eventualmente, pode haver acúmulo em diversos órgãos (27).

Estudos evidenciam que as NPs TiO₂ inaladas podem atravessar a barreira pulmão-circulação, sugerindo que essas se deslocam através da corrente sanguínea, atingindo e ativando células endoteliais e tecidos distantes da “porta” de entrada(27).

A exposição transdérmica relaciona-se ao uso de protetores solares e cosméticos. Contudo, não existem evidências que demonstrem que as NPs TiO₂ sejam capazes de penetrar a pele íntegra. No entanto, o desenvolvimento de protetores solares e outros cosméticos em aerossol torna possível a inalação de NPs TiO₂, as quais podem atingir o sistema circulatório e, a partir de então, serem distribuídas para os mais diversos órgãos e afetá-los (25).

Uma das principais rotas de exposição às NPs TiO_2 é por meio de produtos farmacêuticos e alimentos, em que essas têm sido amplamente utilizadas como corantes opacificantes (25). Ainda, outras rotas de exposição incluem: *i)* ocupacional; *ii)* resíduos derivados de implantes cirúrgicos e *iii)* contrastes administrados endovenosamente. Estudos recentes demonstraram que a exposição oral de camundongos a esse nanomaterial revelou a sua presença em vários órgãos, tais como: fígado, baço, rins e pulmões, sugerindo que as NPs TiO_2 alcançam tecidos e órgãos por meio da absorção pelo trato gastrointestinal, sendo a circulação sanguínea primariamente implicada na sua biodistribuição (27).

As NPs TiO_2 são capazes de gerar efeitos tóxicos em vários órgãos do corpo, causando neurotoxicidade, imunotoxicidade, toxicidade reprodutiva e toxicidade por inalação, embora tais nanopartículas possam ser excretadas do corpo através do suor. Adicionalmente, a toxicidade das NPs TiO_2 relaciona-se com o tamanho da partícula. Oberdörster e colaboradores demonstraram que partículas de TiO_2 de tamanhos menores são mais recalcitrantes, ou seja, mais difíceis de serem removidas do organismo (24–28).

A Figura 2 apresenta em esquema das vias afetadas pelas NPs TiO_2 no organismo.

Figura 2 - Cinética de intoxicação por NPs TiO₂. A linha contínua representa o meio pelo qual as NPs TiO₂ entram no corpo. A linha tracejada representa as reações bioquímicas estimuladas pelas NPs TiO₂ que danificam várias partes do corpo.

Fonte: Adaptação de Carneiro Leão (2016) a partir de Hong e Zhang. Murine liver damage caused by exposure to nano-titanium dioxide. **Nanotechnology**, v. 27, p. 112000, 2016.

Assim, desde que as NPs TiO₂ sejam capazes de atingir a corrente sanguínea, as células do endotélio vascular tornam-se alvos em potencial para a sua toxicidade. Além do mais, essas células apresentam um importante papel na resposta às NPs TiO₂, devido ao seu possível envolvimento em eventos pró-inflamatórios, através do aumento da expressão de interleucinas quimioatraentes, moléculas de adesão — ICAM-1, VCAM-1, PECAM-1, E- e P-seletinas; receptores de membrana celular — receptor de LDL oxidado-1 — LOX-1; fatores celulares — fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), angiotensina II e fator tecidual; estresse oxidativo e morte celular (28). Dessa forma, pode-se correlacionar tais respostas às descobertas de vários estudos que estabelecem uma forte ligação entre as NPs TiO₂ e a etiologia de algumas doenças cardiovasculares (28), como a aterosclerose, em que vários

eventos celulares podem desencadeá-la, incluindo estresse oxidativo, inflamação e ativação das células endoteliais (24).

Nesse ínterim, este estudo apresenta-se inédito ao propor o desenvolvimento de um órgão-em-chip confeccionado em poliéster-toner, mimetizando um vaso sanguíneo, para avaliar a resposta de células endoteliais frente à exposição às NPs TiO_2 , visando a um melhor entendimento dos efeitos biológicos induzidos pela exposição às NPs TiO_2 , bem como elucidar as propriedades citotóxicas desse material tão comumente utilizado atualmente. O desenvolvimento de nanomateriais seguros depende de uma melhor compreensão das interações específicas entre NPs e o organismo. Em adição, também se propõe uma nova plataforma para testes de toxicidade, por intermédio do *microchip* de PT, minimizando custos, tempo de fabricação e o uso de cobaias animais em pesquisa, maximizando respostas mais próximas do sistema *in vivo* e que proporcionem melhores resultados em comparação aos modelos animais ou culturas de células convencionais.

Neste trabalho foi proposto, pela primeira vez, viabilizar a utilização de *microchips* de PT como um órgão-em-chip, no caso um vaso sanguíneo, e testá-lo frente à nanopartículas (NPs) de dióxido de titânio (TiO_2) para avaliar os seus efeitos citotóxicos em células endoteliais.

2 OBJETIVOS GERAIS

O objetivo deste estudo consistiu no desenvolvimento de uma plataforma microfluídica de PT, onde foram cultivadas células endoteliais, a fim de mimetizar um vaso sanguíneo, sendo as respostas celulares avaliadas sob condições de fluxo laminar unidirecional e gradiente químico de NPs TiO_2 , sendo os resultados obtidos no sistema microfluídico comparados a modelos tradicionais de cultura de células.

2.1 Objetivos específicos

- Cultura de células endoteliais de veia de cordão umbilical humano (HUVEC) em plataforma microfluídica de PT;
- Avaliação da compatibilidade dos materiais de confecção do *microchip* para o estabelecimento de culturas de células endoteliais sob perfusão;
- Design e construção de um modelo de *microchip* de PT para ser utilizado em ensaios toxicológicos com células endoteliais;
- Adaptação e cultura de células endoteliais em *microchip*;
- Determinação de VEGF-A por teste imunoenzimático e avaliação das condições de crescimento das células no *microchip*;
- Exposição das células endoteliais em placa de cultura de tecidos às NPs TiO_2 para avaliação da citotoxicidade (MTT);
- Perfusão de NPs TiO_2 sob fluxo laminar unidirecional no *microchip* preenchido com as células endoteliais;
- Coleta do sobrenadante e das células expostas às NPs TiO_2 , em placa e no *microchip*, para avaliação da resposta celular induzida por estresse químico de gradientes de NPs TiO_2 ;
- Análise da morte celular (apoptose) nas células endoteliais após exposição às NPs TiO_2 ;
- Verificação da produção de VEGF-A e ânion superóxido após a exposição das células endoteliais, cultivadas em placa de cultura e no *microchip*, às NPs TiO_2 ;

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Neste trabalho, todas as soluções foram preparadas em água desionizada (resistividade de 18 MΩ cm) e todos os reagentes foram de pureza analítica, sendo utilizados como recebidos dos respectivos fabricantes, sem tratamento prévio ou purificação.

3.1 Preparo do meio RPMI (meio *Roswell Park Memorial Institute*) - Solução estoque

Sob agitação constante, foram dissolvidos 10,4 g de meio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich) em 900 mL de água desionizada. A essa solução, foram adicionados 2 g de bicarbonato de sódio e 4,68 g de HEPES (N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-(2-ácido etanosulfônico)), ambos adquiridos junto à Sigma-Aldrich. Em seguida, o volume foi completado para 1 L e o pH ajustado para 7,2, utilizando-se solução de hidróxido de sódio (NaOH) 1 mol L⁻¹. Posteriormente, o meio foi filtrado sob condições estéreis em um sistema de filtração a vácuo (Kasvi) — filtro de acetato de celulose com porosidade inferior a 0,22 μm — e mantido em estufa a 37 °C durante 72 h, a fim de avaliar a esterilidade do meio de cultura. Após esse período, e não tendo sido observada a presença de agentes adventícios, o meio de cultura foi armazenado a 4 °C.

3.2 Meio de cultura para uso — meio completo

Para uso, o meio de cultura foi suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino (SFB; Cultilab) e 1% (v/v) de uma solução comercial de antibiótico/antifúngico (A/A) proveniente da Sigma-Aldrich.

3.3 Cultura celular

No presente estudo, foi utilizada linhagem de células endoteliais de veia de cordão umbilical humano CRL-2873™ (HUVEC — *Human Umbilical Vein Endothelial Cell*) obtida da coleção americana de cultura de células (ATCC® — *American Type Culture Collection*). As células foram cultivadas a 37 °C em estufa (Sanyo) com atmosfera de 5% de CO₂ em frascos de poliestireno (Corning®) com superfície de crescimento tratada — área: 75 cm² — e meio

RPMI-1640 completo. Diariamente, foi verificada a formação de monocamada confluenta utilizando-se um microscópio invertido Olympus (CKX41).

3.3.1 Preparação das células para utilização

Quando confluenta, a monocamada de células foi liberada do frasco de cultura por tripsinização. Para isso, o meio de cultura foi descartado da garrafa e o tapete celular foi lavado com 5 mL de tampão fosfato salino (PBS — *phosphate buffered saline*). Em seguida, foram adicionados 2 mL de tripsina-ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 1 x (*Sigma-Aldrich*), e as células foram mantidas em estufa a 37 °C por 5 min. Uma vez verificada a completa individualização das células em um microscópio invertido, foram adicionados 4 mL de meio RPMI-1640 completo ao frasco de cultura. Nessa etapa, a tripsina foi neutralizada pelo soro fetal bovino presente no meio de cultura. Após, as células foram cuidadosamente aspiradas da garrafa, transferidas para um tubo de fundo cônico (Corning®) e centrifugadas a 200 x *g* por 5 min à temperatura ambiente. O sobrenadante foi então descartado e o *pellet* celular ressuspensionado em 1 mL de meio de cultura. Em seguida, uma alíquota dessa suspensão de células foi diluída na proporção de 1:20 (v/v) em azul de Trypan 0,04% (*Sigma-Aldrich*). As células foram contadas em câmara de Neubauer (Kasvi), sendo possível, também, avaliar a viabilidade celular — contagem das células não coradas em azul. O volume final foi acertado para a concentração desejada adicionando-se meio de cultura completo.

3.4 Avaliação da citotoxicidade dos componentes do *microchip*

A fim de verificar a compatibilidade dos materiais utilizados na confecção do *microchip* (*i.e.*, filme de poliéster, filme de poliéster impresso com toner e resina epóxi) com as HUVEC, foram realizados testes de citotoxicidade direta e indireta. No primeiro, pretendeu-se avaliar a toxicidade mediada pelo contato direto dos materiais do *microchip* com as células em cultura. No segundo, por outro lado, as células entraram em contato apenas com substâncias solúveis que eventualmente foram liberadas pelos componentes do *microchip*. Para tal, os extratos foram obtidos imergindo-se 1 cm² dos materiais que compõem o *microchip* em meio de cultura completo, sendo mantidos a 37 °C por 48 horas e sem agitação. Após esse período, o meio foi recolhido e procedeu-se os ensaios quantitativos apresentados adiante. Tanto o

teste de citotoxicidade direta/indireta quanto a obtenção dos extratos foram realizados conforme recomendações internacionais (29).

3.4.1 Viabilidade Celular – Ensaio de MTT

A redução do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio) é um método colorimétrico rápido, utilizado para avaliar a sobrevivência e proliferação celular. Baseia-se na capacidade das células viáveis em reduzir o anel tetrazólico, presente no MTT, pela ação da redutase mitocondrial, formando como produto cristais azuis de formazana (30).

Para o ensaio, foram semeados em uma placa de 96 poços de fundo plano (Corning®), 200 µL/poço de uma suspensão a 5×10^5 HUVEC mL⁻¹, dispersas em meio RPMI-1640 completo. A placa foi incubada por 24 h a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂. O sobrenadante foi descartado e, aos poços, foram adicionados os respectivos extratos, conforme descrito no item 3.4. Ainda, como controle positivo e negativo de morte foram utilizados dodecil sulfato de sódio (SDS) 1% (m/v) e meio de cultura completo, respectivamente. A placa foi incubada em estufa por 24 h, a 37 °C e 5% de CO₂. Após descartar o sobrenadante, 20 µL de uma solução de MTT (Sigma- Aldrich) — 5mg mL⁻¹ em meio RPMI não-suplementado — foram adicionados aos poços da placa, sendo a placa posteriormente incubada por 4 h nas mesmas condições anteriores. Transcorrido esse período, o sobrenadante foi cuidadosamente descartado e adicionou-se a cada poço 200 µL de dimetilsulfóxido (DMSO), a fim de solubilizar os cristais de formazana formados. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro UV/visível (Multiskan Ascent, Labsystems), em 595 nm. A viabilidade celular foi calculada em porcentagem, considerando-se o controle negativo como 100% de viabilidade celular. Os ensaios foram realizados em triplicata e de forma independente.

3.4.2 Determinação da produção de óxido nítrico

Visando avaliar uma possível resposta inflamatória decorrente do contato dos materiais do *microchip* com as HUVEC, o óxido nítrico (NO) foi quantificado indiretamente, mensurando-se o acúmulo de nitrito no sobrenadante da cultura de células, por meio do método colorimétrico de Griess (31).

Assim como no ensaio de MTT, 200 μL /poço de uma suspensão a 5×10^5 HUVEC mL^{-1} foram plaqueadas e incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO_2 por 24 h. Em seguida, os extratos e os fragmentos de poliéster, poliéster recoberto com toner e cola epóxi foram adicionados, bem como os controles: negativo (meio de cultura completo) e positivo (10 ng mL^{-1} de $\text{TNF-}\alpha$ — Fator de Necrose Tumoral Alfa). Ao final desse período, foram coletados 50 μL de sobrenadante da cultura celular, sendo transferidos para uma outra placa de 96 poços de fundo plano (Corning®). A essa placa, foram adicionados 50 μL de solução de Griess — composta por: **solução A**: 0,1% (m/v) de dicloridrato de N-(1-naftil)-etilenodiamina (Sigma-Aldrich); **solução B**: 1% (m/v) de sulfanilamida (Reagen), ambas preparadas em ácido ortofosfórico (H_3PO_4 ; Vetec) 5% (v/v) e misturadas na proporção de 1:1 (v/v) ao realizar o ensaio. Decorridos 10 min de incubação à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, a absorbância foi determinada em 540 nm em um leitor de placas Multiskan Ascent (Labsystems). As concentrações de NO liberadas nos sobrenadantes das culturas celulares foram determinadas a partir de uma curva analítica previamente obtida com concentrações molares conhecidas de NaNO_2 (faixa: 0,4 – 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$) em meio RPMI completo e os valores foram expressos em $\mu\text{mol L}^{-1}$ de nitrito.

3.5 Microfabricação do dispositivo de poliéster-toner

3.5.1 Tratamentos do filme de poliéster

Após alguns testes, com os quais se avaliou a aderência das HUVEC no poliéster, observou-se que essas não se aderiam a contento nesse material, sendo, portanto, necessário realizar um tratamento de superfície para proporcionar melhores condições para a aderência celular. Por conseguinte, o poliéster foi submetido a dois tratamentos, quais sejam: *i*) modificação com plasma de oxigênio e *ii*) adsorção de proteínas.

3.5.2 Tratamento de superfície com plasma de oxigênio

A interação do plasma de oxigênio com filmes poliméricos acarreta, principalmente, mudanças na polaridade da superfície, o que pode melhorar a adesão celular. A adesão em superfícies é um resultado da adsorção de proteínas celulares pelo substrato, cujas interações

envolvem espécies iônicas, ligações de hidrogênio e forças eletrostáticas. O tratamento por plasma torna a superfície estéril por meio da eliminação de microrganismos, tais como bactérias, fungos e vírus (32). Por conseguinte, previamente à montagem do *microchip*, o filme de poliéster foi tratado com plasma de oxigênio com potência, pressão e tempo definidos, sendo, respectivamente, 100 W e 70 mtorr por 20 seg.

3.6 Caracterização da topografia dos filmes de poliéster: Energia livre de superfície e Análises por microscopia de força atômica (AFM)

A hidrofiliabilidade é um dos fatores mais importantes que afetam a citocompatibilidade dos biomateriais. A adesão e o crescimento celular em superfícies são influenciados pelo balanço hidrofiliabilidade/hidrofobicidade, frequentemente descritos como molhabilidade. Embora não haja uma correlação óbvia entre hidrofiliabilidade e comportamento celular, alguns trabalhos demonstram que células preferem se ancorar em superfícies hidrofílicas (33–35).

A energia livre de superfície dos filmes de poliéster, antes e após tratamento com plasma de oxigênio, foi determinada de forma indireta, a partir de medidas de ângulo de contato pelo método da gota séssil, utilizando-se três líquidos distintos cujos valores das componentes de tensão interfacial (γ_L) são conhecidos (Tabela 1).

Tabela 1 - Componentes de tensão interfacial dos líquidos.

Líquidos	γ_i mJ m ⁻²	γ_i^p mJ m ⁻²	γ_i^d mJ m ⁻²
Água	72,8	51,0	21,8
Formamida	58,2	18,7	39,5
Etilenoglicol	48,0	19,0	29,0

Fonte: Autoria própria.

O erro estimado para as medidas de ângulo de contato foi de $\pm 3^\circ$. Todas as medidas foram realizadas à temperatura ambiente e os valores relatados são uma média de três experimentos. Os valores das componentes polares (γ_L^p) e dispersivas (γ_L^d) foram estimados pelo modelo de Owens-Wendt (34–36).

Imagens da superfície de amostras de poliéster tratadas ou não com plasma de oxigênio foram analisadas por microscopia de força atômica (AFM — *Atomic Force Microscopy*) em um equipamento da Nanosurf AG (modelo EasyScan 2). Em todas as análises de AFM, o modo oscilante foi empregado, utilizando-se sondas de silício com uma frequência de ressonância de 190 kHz.

3.7 Fabricação do *microchip* de PT

A partir de um *design* com características minimalistas, foi escolhida uma geometria reta para o microcanal. O *microchip* PT foi fabricado de acordo com a abordagem de impressão, corte e laminação descrita por Thompson e colaboradores (15). Resumidamente, o *microchip* foi desenhado em software gráfico CorelDRAW®15 (Corel Corporation, Canadá) e impresso em filmes de poliéster, utilizando-se uma impressora LaserJet (1200 series; Hewlett Packard, EUA) operando a 600 pontos por polegada (dpi — *dots per inch*). O filme de poliéster foi tratado com plasma de rádio frequência (RF) de oxigênio a 50 W e 70 mTorr durante 2 minutos (plasma ETCH - Carson City - EUA), previamente à montagem do *microchip*. Uma vez que a profundidade do canal é determinada pela espessura da camada de toner impresso — aproximadamente 6 μm , segundo dados de perfilometria Figura 3 **A** — foi utilizada uma camada intermediária adicional de poliéster (Figura 3 **B**) a fim de proporcionar suficiente profundidade ao microcanal. Para isso, a mesma geometria do microcanal impresso em toner foi utilizada e recortada, com o auxílio de uma cortadora a laser de CO₂, em um filme de poliéster. Depois disso, no topo do *microchip*, foram perfurados acessos de 0,3 cm de diâmetro para fornecer acesso ao microcanal. Posteriormente, as três camadas de filmes foram alinhadas e laminadas em conjunto, usando um laminador AC 00-1230 (Gazela, Brasil) operando a 120 °C e 40 cm min⁻¹. Finalmente, adaptadores tipo fêmea foram colados com uma resina epóxi sobre os furos de acesso ao canal. A Figura 4 mostra o esquema de montagem do *microchip* de PT, bem como as dimensões e a estrutura do chip.

Figura 3 – Imagens de perfilometria do microcanal impresso em toner (A) e do intermediário recortado em filme de poliéster (B).

Fonte: Autoria própria.

Figura 4 - Desenho, dimensões e estrutura de montagem do *microchip* de PT. Tanto o substrato superior (TL) e inferior (BL) são produzidos a partir da impressão direta a laser, em que uma camada de toner delimita um canal de 6 μm de altura, 2,0 cm de comprimento, 0,2 cm de largura e dois círculos de 0,3 cm de diâmetro em cada extremidade. Para acesso ao microcanal, a camada superior (TL) dispõe 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 de poliéster (ML), recortada com o auxílio de uma cortadora a laser de CO₂, amplia as dimensões da câmara onde será realizado o cultivo de células. 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 faz as vezes de promover a adesão entre as camadas constituintes do *microchip*, por meio da fusão do toner durante a etapa de laminação a quente. Devido a essa etapa, a altura final do microcanal é de aproximadamente 103 μm, resultado da deformação da camada de toner.

Fonte: Autoria própria.

3.8 Estudo da fluídica e da vazão no *microchip* de PT

Anteriormente à injeção da suspensão celular no *microchip*, foi verificada se as dimensões escolhidas para a geometria do microcanal atenderiam, adequadamente, os propósitos do presente estudo. Para isso, deixou-se fluir por capilaridade um corante através do microcanal. A sequência de imagens é mostrada na Figura 5. Nota-se que o corante alcança a extremidade oposta facilmente, indicando que as dimensões são adequadas.

Figura 5 - Sequência de imagens da perfusão de corante no *microchip* de PT por capilaridade. Dimensões do microcanal: 2 cm de comprimento x 2 mm de largura x 103 μm de altura. O tempo total para o corante fluir através do microcanal foi de 31 s.

Fonte: Autoria própria.

Várias vazões foram testadas na bomba de seringa para verificação daquela que não danificaria o *microchip* e pudesse simular um sistema fluídico similar as condições de perfusão *in vivo*, ficando então estabelecida a vazão de $2 \mu\text{L min}^{-1}$. Desse modo, foi montado um sistema composto por uma bomba de seringa, uma seringa de 5mL estéril contendo meio RPMI suplementado com “mix” de antibióticos e antifúngicos e com 20% de SFB. A seringa foi acoplada ao *microchip* de PT por meio de um escalpe, sendo esse encaixado a base de

ponteiras de pipetadores que fizeram as vezes de um adaptador fêmea. O sobrenadante foi recolhido no orifício oposto ao de injeção usando o mesmo sistema que foi acoplado à seringa, tendo, neste caso, a parte terminal acoplada a um tubo do tipo Falcon de 15mL estéril vedado por filme plástico (Parafilm M® – Bemis, EUA). A Figura 6 ilustra esse esquema experimental.

Figura 6 – Representação esquemática da cultura de células sob perfusão.

Fonte: Autoria própria

Durante os experimentos de cultura celular sob perfusão, manteve-se todo o sistema (*microchip* e bomba de seringa) no interior de uma estufa a 37 °C e 5% de CO₂.

3.9 Modificação biológica – Adsorção de proteínas

O método visa a 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. As macromoléculas mais utilizadas são da classe das proteínas (3). Assim, os *microchips* já montados foram tratados com 50 µL de solução de fibronectina (Sigma-Aldrich) na concentração de 10 µg mL⁻¹, adicionado em um dos reservatórios e incubado *overnight* a 4 °C. Testes também foram realizados com uma

solução de vitronectina (Sigma-Aldrich) na concentração de $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$, incubado por 2 h a 37°C . Antes da injeção da suspensão celular, o excesso de solução foi retirado e os *microchips* foram mantidos em estufa por 1 h.

3.10 Estabelecimento da cultura de células no *microchip* de PT

A fim de atender as demandas fisiológicas das células sob perfusão, o meio de cultura deve ser reabastecido com uma frequência e volume adequados. Se o volume do meio em que as células estão a crescer é demasiado baixo, ou o meio não é provido a uma frequência conveniente, nutrientes podem ser rapidamente esgotados e metabólitos tornam-se demasiadamente concentrados no meio em que as células estão contidas, resultando em efeitos deletérios sobre a função ou proliferação celular. Em contrapartida, se o volume inicial de meio é muito elevado ou a frequência de reposição é muito rápida, as células podem não serem capazes de se condicionarem ao seu ambiente de forma adequada

Para a distribuição das células no microcanal, foram realizados estudos para avaliação do volume e tempo de injeção da suspensão celular no *microchip*, a fim de que não houvesse danos às células e nem ao *microchip*. As células foram injetadas manualmente em um dos orifícios do *microchip*, numa concentração padronizada para 5×10^6 células mL^{-1} em meio RPMI-1640 completo, suplementado de 1 mmol L^{-1} de MgCl_2 e 1 mol L^{-1} de MnCl_2 . Para isso, foi utilizada uma seringa de 3 mL, contendo a suspensão celular, conectada a um escalpe acoplado à base da ponteira, colada ao *microchip*, por intermédio de uma conexão feita de tubo Tygon. Após a injeção da suspensão celular, o *microchip* foi cuidadosamente inserido dentro de uma garrafa de cultura celular de 75 cm^2 , estéril e com tampa possuindo filtro, sendo essa levada à estufa a 37°C e 5% de CO_2 . Padronizou-se aguardar 4 h a fim de garantir a aderência celular ao material do *microchip*, previamente à perfusão. O *microchip* foi perfundido com o meio de cultura RPMI completo com o auxílio de uma bomba de seringa, para a manutenção de um fluxo unidirecional e constante sobre as células. O meio de cultura fluiu sobre as células, simulando a corrente sanguínea, sendo testados vários tempos de perfusão (8, 16, 24, 48, 72 e 96 h) e vazões ($1 \mu\text{L min}^{-1}$, $2 \mu\text{L min}^{-1}$, $5 \mu\text{L min}^{-1}$ e $10 \mu\text{L min}^{-1}$), até que a ideal pudesse ser estabelecida: $2 \mu\text{L min}^{-1}$. Os *microchips* foram mantidos em estufa a 37°C , assim como um controle estático. O sobrenadante resultante desse ensaio foi

coletado no acesso de saída (oposto àquele em que o meio de cultura foi injetado) e armazenado a -20 °C.

3.11 Avaliação da viabilidade, morfologia, adesão e confluência

3.11.1 Proliferação celular no interior do *microchip*

A viabilidade, morfologia, adesão ao material, proliferação e a confluência das células injetadas no *microchip* foram analisadas para avaliação da ambientalização e sobrevivência das células no dispositivo. Esses parâmetros e a velocidade de crescimento celular foram avaliados comparando-os a células depositadas numa placa de cultura celular de 48 poços (Corning®) nas mesmas concentrações e condições a que foram submetidos os *microchips* estáticos (5% de CO₂ e 37 °C). Foi realizada a introdução de azul de Trypan em um dos orifícios em vários tempos (tempo zero e a cada 24 h) do experimento e observou-se as células em um microscópio invertido — sendo consideradas células refringentes como viáveis e células coradas em azul mortas. Além disso, as células nos *microchips*, perfundido e estático, foram avaliadas a cada 24 h durante todo o tempo do experimento, em que foram observadas morfologia e refringência.

A avaliação das alterações celulares e da capacidade de sobrevivência após permanência no *microchip* também foram realizadas. Para isso, as células mantidas sob perfusão e as do controle estático foram retiradas do *microchip*. Sob condições estéreis, o *microchip* foi descolado com o auxílio de uma pinça. Em seguida, as células foram retiradas do canal de crescimento por meio de dissociação mecânica. As células foram ressuspensas em volume final de 1 mL de meio de cultura RPMI completo e transferidas para um tubo cônico (Eppendorf). Para avaliação da capacidade de adesão ao material das placas de cultura após passagem pelo *microchip*, a suspensão celular foi depositada em orifícios de uma placa de cultura celular de 24 poços e adicionadas de 1 mL de meio RPMI completo e incubada em estufa a 37 °C e 5% de CO₂ por 24 h. Decorrido esse período, as células também foram avaliadas quanto a sua capacidade de crescimento e modificação das características morfológicas. Para avaliação da viabilidade celular pelo método de MTT, após a retirada das células que permaneceram sob perfusão ou não no *microchip*, por 8, 16, 24 e 48 h, essas foram contadas em câmara de Neubauer, ressuspensas em RPMI-1640 completo e distribuídas em

placa de microtitulação de 96 orifícios de fundo plano (Corning®) a uma concentração de 5×10^5 HUVEC mL⁻¹ por poço. A placa foi incubada por 2 h, a 37 °C e 5% de CO₂ para aderência celular. Na sequência, foi utilizado o procedimento descrito no item 3.4.1 partindo-se da etapa de adição de MTT (1 mg mL⁻¹) após o descarte do sobrenadante.

3.12 Determinação de VEGF-A por teste imunoenzimático

Os sobrenadantes de perfusão das células HUVEC contidas nos *microchips* foram coletados em tubos cônicos de 15 mL (Corning®). A cada 24 h (tempo final: 96 h) esses sobrenadantes foram recolhidos, centrifugados a 300 x *g* por 10 min, aliquotados em tubos tipo eppendorf e estocados a -20 °C até o momento da determinação do VEGF-A. Para comparação, o mesmo procedimento foi realizado em placas de poliestireno de 24 poços (sistema estático). Esse fator foi dosado através do kit Human VEGF-A Platinum ELISA adquirido junto à BD Biosciences, utilizando o protocolo fornecido pelo fabricante.

3.13 Ensaios com nanopartículas de dióxido de titânio (NPs TiO₂)

3.13.1 Controles das reações

Como controle positivo da ativação endotelial, HUVEC foram expostas à 10 ng mL⁻¹ de TNF- α humano recombinante (Sigma-Aldrich) em todos os ensaios. SDS 1% (m/v) foi utilizado como controle positivo de morte celular no ensaio de MTT. Como controle negativo de todas as reações, foi utilizado meio de cultura.

3.13.2 Preparação das NPs TiO₂

As NPs TiO₂ obtidas comercialmente foram esterilizadas em autoclave a 1,5 atm por 20 min. Foi preparada uma solução estoque na concentração de 5mg mL⁻¹ dispersa em água ultrapura estéril. Essa solução foi submetida ao ultrassom por 15 min, para uma melhor dispersão das NPs, sendo posteriormente armazenada à -20°C.

3.13.3 Avaliação da viabilidade celular frente às NPs TiO₂

O teste de MTT foi realizado para a definição da melhor concentração de NPs TiO₂ a ser utilizada nos testes. As concentrações de 10 e 50 µg mL⁻¹ serviram como ponto de partida para a escolha das concentrações a serem testadas. Segundo Montiel-Davalos *et al.*, (24) essas são concentrações presentes em fármacos intravenosos, e exposição ambiental. Em adição, estudos tem relatado que tais concentrações promovem o aumento da expressão de genes inflamatórios, sem morte celular. Como controle negativo, foram utilizados volumes iguais de água, em vez da suspensão de NPs TiO₂.

As HUVEC foram expostas à diferentes concentrações da solução de NPs TiO₂ (100, 50, 25, 20, 10, 5 µg mL⁻¹) dispersas em meio de cultura. A viabilidade celular, avaliada pelo método de MTT, foi calculada em porcentagem, considerando-se o controle negativo como 100% de viabilidade.

3.13.4 Obtenção do sobrenadante de cultura celular para análise

3.13.4.1 Cultura em placa – sistema estático

Para esse teste, uma suspensão de HUVEC a 5 x10⁶ mL⁻¹, foi adicionada aos orifícios de uma placa de cultura celular de 48 poços. A placa foi incubada a 37 °C com 5% de CO₂ por 24 h, para permitir a aderência celular. As células foram expostas, por 24 h, a diferentes concentrações de NPs TiO₂ (100, 50, 25, 20, 10, 5 µg mL⁻¹) e ao estímulo controle-positivo (TNF-α), dispersos em meio de cultura. Como controle negativo, foi utilizado o meio de cultura RPMI-1640 suplementado com 20% de SFB. O sobrenadante foi aspirado, disposto em um tubo cônico e centrifugado a 3.000 x g, 4 °C, por 10 min. O *pellet* foi descartado e o material restante foi aliquoteado e armazenado a -80 °C, até o momento do uso para as dosagens.

3.13.4.2 Cultura em *microchip* – sistema dinâmico ou microfluídico

O crescimento das HUVEC foi estabelecido no *microchip* conforme padronizado. O *microchip* foi perfundido com soluções de NPs TiO₂ em meio de cultura, em diferentes

concentrações (100, 50, 25, 20, 10, 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$), com o auxílio de uma bomba de seringa para a manutenção de um fluxo laminar e unidirecional contínuo de 2 $\mu\text{L min}^{-1}$ sobre as células. O sistema (bomba e *microchip*) foi mantido no interior de uma estufa a 37 °C com 5% de CO_2 durante todo o ensaio. Ao final, o sobrenadante foi coletado, centrifugado a 3.000 x *g*, 4 °C, por 10 min e armazenado a -80 °C para as análises futuras. Como controle, foi coletado o sobrenadante de perfusão sem NPs TiO_2 (somente meio de cultura).

3.14 Determinação de VEGF-A por ensaio imunoenzimático (ELISA)

Os sobrenadantes de perfusão das HUVEC, contidas nos *microchips* (ensaio dinâmico) e das culturas em placa de poliestireno de 24 poços (ensaio estático), expostas à diferentes concentrações de NPs TiO_2 , foram centrifugados a 300 x *g* por 10 min, aliquotados em eppendorfs e estocados a -80 °C até o momento da determinação do VEGF-A. Esse fator foi dosado através do kit *Human VEGF-A Platinum ELISA* (BD Biosciences), conforme o protocolo fornecido pelo fabricante.

3.15 Avaliação da produção de ânion superóxido *in situ*

O estresse oxidativo é um evento crítico da inflamação, ativação e disfunção endotelial (24). Para avaliar a indução desse estresse pela exposição das HUVEC às NPs TiO_2 , foi analisada foi utilizado o protocolo descrito por Han *et al.*, o qual utiliza os reagentes dihidroetídio (DHE) (*Molecular Probes, Invitrogen*) e MitoSOX (*Life-Invitrogen*), indicador vermelho de superóxido mitocondrial. O DHE é uma sonda fluorescente sensível às espécies reativas de oxigênio, em particular ao ânion superóxido. Quando o DHE é oxidado pelo superóxido, as células fluorescem em vermelho. Para confirmar a produção de superóxido, foi usado o MitoSOX, que seletivamente detecta a produção de superóxido mitocondrial. O protocolo foi utilizado em lâminas para cultura de células (Nunc™ Lab-Tek™ II – Thermo Fischer) como controle estático, sendo também adaptado para os *microchips*.

Células HUVEC na densidade de 5 x 10⁶ células/mL foram incubadas tanto em lâminas com 8 câmaras para crescimento celular como, também, nos *microchips* de PT. As células foram expostas à diversas concentrações de NPs TiO_2 em meio RPMI com 10% de SFB, são

elas: 100, 50, 25, 20, 10 e 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, a um controle negativo composto de meio RPMI com 10% de SFB, assim como a um controle positivo de ativação endotelial, TNF- α .

Os sobrenadantes das culturas foram retirados, e em cada grupo de *microchips* tratado com uma concentração de NPs TiO_2 havia 3 *microchips* (todos tratados com a mesma concentração), sendo que em um *microchip* foi adicionado 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de DHE, em outro 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de MitoSOX e em outro o mesmo volume de DMSO (controle dos reagentes fluorescentes, pois os mesmos foram diluídos em DMSO). Isso foi feito para todas as concentrações testadas.

O mesmo tratamento, com DHE, MitoSOX e DMSO, foi realizado nas lâminas nos seus compartimentos para cultura de células, sendo 3 compartimentos tratados com a mesma concentração de NPs TiO_2 . Isso foi feito para todas as concentrações avaliadas.

Após a adição das sondas fluorescentes, os *microchips* e as lâminas foram incubados por 15 min em estufa a 37 °C, 5% de CO_2 e ao abrigo da luz, como recomendado pelo fabricante. Os dispositivos foram lavados 3 vezes com PBS (pH 7,4) e então foi adicionado paraformaldeído 4% para a fixação e incubou-se por 15 min, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Lavou-se novamente por 3 vezes com PBS. As lâminas tiveram as câmaras desmontadas e foi adicionado 1 gota de *Prolong Gold Antifade* contendo DAPI (Life-Invitrogen), assim como nos *microchips*. A lâmina foi coberta por 1 lamínula e ambos os dispositivos (lâmina e *microchip*) foram incubados por 24 h à temperatura ambiente e ao abrigo da luz.

Para a obtenção das imagens, foi utilizado um microscópio de fluorescência Olympus — gentilmente disponibilizado pelos professores Luiz Antônio Carlos Bertollo e Marcelo de Bello Cioffi do Departamento de Genética e Evolução da Universidade Federal de São Carlos — sendo operado na faixa de excitação/emissão: 510/580 nm para observação das amostras marcadas com MitoSOX e DHE e 364/454 nm para visualização do núcleo marcado com DAPI.

3.16 Avaliação do processo de morte celular in situ com laranja de acridina e brometo de etídio

A coloração diferencial pelo brometo de etídio (BE)/laranja de acridina (LA) permite a diferenciação entre células viáveis daquelas em processo de morte por apoptose ou necrose, por meio da revelação por fluorescência com base em alterações morfológicas nucleares e

citoplasmáticas. O LA é um corante fluorescente que possui alta afinidade por DNA e RNA, e possui a capacidade de atravessar a membrana íntegra de células vivas ou em processo de morte e fluir rapidamente pelo citoplasma ligando-se à estas moléculas e também à lisossomos (28), podendo corar as células em verde, laranja ou vermelho dependendo do pH. O BE, por sua vez, também é um corante fluorescente que possui a capacidade de se intercalar no DNA, porém esse só consegue penetrar em células que apresentem alterações na permeabilidade da membrana, corando-as em vermelho.

Para avaliação do efeito da exposição das células às NPs TiO₂ nos sistemas estático e dinâmico, foram utilizados *in situ* os corantes laranja de acridina (3,6-dimetilaminoacridina) e brometo de etídio, com os quais foi possível analisar se as células encontravam-se em processo de morte e, se sim, discriminá-la em apoptótica ou necrótica.

HUVEC na densidade de 5×10^6 células mL⁻¹ foram incubadas tanto em lâminas com 8 câmaras para crescimento celular (Nunc™ Lab-Tek™ II – Thermo Fischer) quanto nos *microchips* de PT. As células foram expostas à soluções de NPs TiO₂ em RPMI com 10% de SFB em diversas concentrações (100, 50, 25, 20, 10 e 5 µg mL⁻¹), controle negativo composto de RPMI com 10% de SFB e controle positivo de ativação endotelial: 10 ng mL⁻¹ de TNF-α. Após esse período, o sobrenadante foi retirado, centrifugado à 1500 x *g* por 10 min e armazenado à -80 °C. As câmaras das lâminas e os *microchips* foram lavados 3 vezes com PBS pH 7,4.

Em seguida, para ambos os sistemas, 30 µL da solução corante (1:1) de LA (100 µg mL⁻¹)/BE (100 µg mL⁻¹) foram adicionadas em cada câmara ou no *microchip*. Após 1 min à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, o corante foi retirado e as lâminas e os *microchips* foram lavados 3 vezes com PBS. A lâmina foi desmontada e ambos foram levados imediatamente ao microscópio de fluorescência para observação dos efeitos das NPs TiO₂ nas células.

Para a obtenção das imagens, foi utilizado um microscópio de fluorescência Olympus, gentilmente disponibilizado pela professora Janice Rodrigues Perussi do Departamento de Química e Física Molecular – IQSC/USP, bem como os reagentes para esse ensaio.

A combinação de filtros utilizada foi: faixa de excitação: 470-490 nm e emissão de 515 nm

Para quantificar o percentual de cada um dos eventos celulares (células viáveis, necróticas, apoptóticas), foram contadas 300 células de cada amostra e calculada a

porcentagem de células em cada estágio. Micrografias das lâminas e *microchips* foram obtidas para o registro visual das possíveis alterações.

Foram realizadas as seguintes considerações:

1. Células viáveis são coradas em verde;
2. Células em apoptose precoce são coradas com o núcleo vermelho e o citoplasma verde;
3. Células em apoptose tardia são coradas em alaranjado;
4. Células necróticas são coradas em vermelho.

3.17 Avaliação do processo de morte celular *in situ* com YO-PRO-1 e Iodeto de Propídio

O tipo de morte celular, apoptótica ou necrótica, causado pelo contato das células HUVEC com as NPs TiO₂ foi confirmado utilizados *in situ* os corantes YO-PRO-1 (quinolinium 4-[(3-methyl-2(3H)-benzoxazolylidene)methyl]-1-[3-(trimethylammonio)-propyl]-diiodide) com iodeto de propídio (PI).

Durante o processo de apoptose, a membrana celular torna-se permeável ao corante fluorescente YO-PRO-1, e as células fluorescem em verde, ao passo que aquelas que se encontram em processo necrótico são permeáveis ao corante PI e fluorescem em vermelho. Dessa forma, o uso conjunto dos dois corantes é um indicador sensível do processo de apoptose.

O protocolo utilizado foi o descrito por Gawlitta *et al.*(37), em que foram utilizados 1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de YO-PRO-1 (Y3603, *Molecular Probes*) e 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de PI (P3566, *Molecular Probes*).

HUVEC na densidade de 5×10^6 células/mL foram cultivadas tanto em lâminas com 8 câmaras para crescimento celular (Nunc™ Lab-Tek™ II – Thermo Fischer) quanto nos *microchips* de PT. As células foram expostas à soluções de NPs TiO₂ em meio RPMI com 10% de SFB em diversas concentrações (100, 50, 25, 20, 10 e 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$), assim como ao controle negativo composto de meio RPMI com 10% de SFB. Após esse período, o sobrenadante foi retirado, centrifugado à 1500 x *g* por 10 min e armazenado à -80 °C. As câmaras das lâminas e os *microchips* foram lavados 3 vezes com PBS pH 7,4. Uma mistura de proporções iguais de 1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de YO-PRO-1 e 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de PI, em volume de 30 μL foi aplicada no *microchip* e em cada câmara da lâmina. Esses permaneceram ao abrigo da luz a 37 °C por 30 min. Em seguida, foram visualizados em microscópio de fluorescência utilizando os filtros necessários

à cada uma das excitações e emissões, sendo 490/638 nm excitação/emissão para o PI e 491/509 nm para o YO-PRO-1.

Para a captura das imagens, foi utilizado um microscópio de fluorescência Olympus disponibilizado pelos professores Luiz Antônio Carlos Bertollo e Marcelo de Bello Cioffi do Departamento de Genética e Evolução da Universidade Federal de São Carlos – UFSCar.

3.18 Análises estatísticas

Todos os resultados foram expressos como valor médio $\pm$ desvio padrão da média de três ensaios independentes ($n = 3$). Para avaliar o nível de significância, foram realizadas análises de variância de um fator (*one-way* ANOVA) seguida pelo teste de Tukey para comparações múltiplas. Além disso, comparações contra grupos controle foram feitas usando *one-way* ANOVA seguida de teste bilateral de Dunnett. Valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo em todos os casos.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Ensaio para avaliação da toxicidade dos materiais componentes do *microchip*

Previamente à montagem do *microchip*, investigou-se os efeitos citotóxicos dos materiais utilizados para a sua confecção, quais sejam: filme de poliéster, toner depositado sobre filme de poliéster e resina epóxi.

No ensaio para avaliação da viabilidade celular (teste MTT), não se verificou morte celular significativa ($p < 0,05$) em ambos os testes de citotoxicidade direta e indireta, em comparação ao controle negativo. Além do mais, ainda que possa ser observada uma ligeira redução da viabilidade celular no teste de citotoxicidade direta, sugere-se que isso seja decorrente do efeito compressivo dos materiais sobre as células durante o período do experimento (24 h), ao invés da toxicidade dependente do contato direto com os referidos materiais. Ainda, o teste de citotoxicidade indireta mostrou que os materiais não liberam nenhuma substância tóxica solúvel para o meio de cultura. A Figura 7 corresponde aos resultados obtidos pelo teste MTT.

Figura 7 - Análise da citotoxicidade direta e indireta dos materiais utilizados para a confecção do *microchip* pelo teste MTT. Controle negativo: meio de cultura. Controle positivo: SDS 1%. Concentração de células por poço: 5×10^5 . Condições da cultura: 24 h; 37 °C e 5% de CO₂. Resultados expressos como viabilidade média $\pm$ desvio padrão (barras de erro). Análises estatísticas foram realizadas utilizando-se ANOVA de um fator e teste bilateral de Dunnett para comparações com o controle negativo. *p < 0,05 com respeito ao controle negativo.

Fonte: Autoria própria.

A fim de avaliar o efeito dos diferentes materiais componentes do *microchip* na produção de óxido nítrico (NO), quantificou-se o acúmulo do seu produto estável de degradação, nitrato (NO₂⁻), no meio de cultura pelo método colorimétrico de Griess. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 8. A exposição direta das células endoteliais aos materiais testados (contato direto), bem como aos seus respectivos extratos (contato indireto), não resultou na produção de NO, observando-se produção de NO apenas no controle positivo (TNF- α 10 ng mL⁻¹), como já esperado.

Figura 8 - Efeito dos materiais componentes do *microchip* na produção de óxido nítrico (NO) em HUVEC. Controle negativo: meio de cultura. Controle positivo: TNF- α 10 ng mL⁻¹. Concentração de células por poço: 5 x 10⁵. Condições da cultura: 24 h; 37 °C e 5% de CO₂.

Fonte: Autoria própria.

Dentro das condições experimentais adotadas, os resultados obtidos indicaram que os materiais utilizados para a confecção do *microchip* não são tóxicos à cultura de HUVEC. Por conseguinte, pôde-se dar prosseguimento à microfabricação do dispositivo.

4.2 Cultura de células no *microchip* de PT microfluídico

As suspensões de células (5 × 10⁶ células/mL) injetada no *microchip* (estático e dinâmico) foram observadas, avaliada, e fotografadas a cada 24 h. A Figura 9 mostra as micrografias dos canais antes (Fig. 9 A) e depois (Fig. 9 B) da injeção das células no interior do dispositivo, podendo ser observada a morfologia esférica das células logo após a sua injeção.

Figura 9 - Micrografias do *microchip* antes e após a injeção das células. **(A)** *Microchip* de PT, sem tratamento e vazio – pontos escuros na superfície do poliéster são provenientes do seu processo de fabricação. **(B)** Células (círculos com o centro claro) no interior do *microchip* de PT (não tratado) logo após a injeção. Concentração celular: 5×10^6 células HUVEC/mL. Escala: 100 μm .

Fonte: Autoria própria.

A Figura 10 apresenta as células no interior dos *microchips* (não-tratados) dinâmico **(A)** e estático **(B)** após 96 h de perfusão. Pode-se observar que as células perfundidas com meio de cultura **(A)** permaneceram refringentes, sugerindo estarem vivas, aderidas e com morfologia arredondada. Em **(B)** observa-se as células pouco refringentes, menores e com a perda da morfologia inicial, sugerindo estarem em processo de morte. O aspecto das células, como o apresentado em **(B)**, é observado a partir de 6 h de permanência na estufa e, portanto, sem a perfusão do meio de cultura. Observa-se ainda que a manutenção da perfusão de meio de cultura é essencial para a sobrevivência celular.

Figura 10 - Micrografia das células no interior do *microchip* PT (não-tratado). (A) *microchip* dinâmico: após perfusão por 96 h a uma vazão de $2 \mu\text{L min}^{-1}$. (B) *microchip* estático: após permanecer por 96 h na estufa a 37°C e 5% de CO_2 . Concentração celular: 5×10^6 HUVEC/mL. Escala: $100 \mu\text{m}$.

Fonte: Autoria própria.

4.3 Comparação das diferenças morfológicas

Durante 96 h de perfusão e observação das células no interior do *microchip* (não tratado com plasma de oxigênio nem fibronectina), as HUVEC que, caracteristicamente sob condições de cultivo em garrafa ou placa de poliestireno apresentam-se em formato alongado (Figura 11 A), permaneceram durante todo o tempo em formato esférico (Figura 11 B).

Figura 11 - Avaliação morfológica das células HUVEC. (A) 24 h em garrafa de poliestireno. (B) 24 h no interior do *microchip* de PT (não-tratado). Escala: $100 \mu\text{m}$.

Fonte: Autoria própria.

Pode-se inferir, portanto, que o material do *microchip* (poliéster) não estava favorecendo a adesão celular. Para que ocorra uma boa interação polímero-célula é necessário que se estabeleça a adesão celular ao substrato. Embora o substrato não necessite obrigatoriamente apresentar características semelhantes às da matriz extracelular afim de ocorrer a adesão, a similaridade físico-química é desejável, a destacar quando se objetiva a promoção da diferenciação celular (6,38,39). Somente após aderidas as células iniciam seu processo de espalhamento, divisão e produção de uma nova matriz extracelular (40). O espalhamento, por sua vez, é um processo complexo que envolve modificações na morfologia celular em consequência de alterações no citoesqueleto, criando assim uma melhor interação com o substrato.

4.4 Avaliação da viabilidade celular no *microchip*

A viabilidade das células injetadas no *microchip* (não-tratado) foi avaliada com o intuito de verificar a sua ambientalização e sobrevivência no dispositivo. A cada 24 h do início do experimento (tempo final: 96 h) as células foram observadas ao microscópio para avaliação da morfologia e da refração. Também foi introduzido em um dos orifícios dos *microchips*, perfundido e estático, azul de tripan 0,01%. Células refringentes caracterizaram viabilidade, e portanto, consideradas vivas (Figura 12A). Em contrapartida, células coradas em azul (mostradas em cinza na Figura 12B) foram consideradas mortas, dada à difusão do corante para o seu interior em decorrência da não integridade da membrana.

Figura 12 - Células no interior do *microchip* de PT (não-tratado) coradas com azul de tripan 0,01%. **(A)** Células perfundidas por 96 h, refringentes. **(B)** Células contidas no interior do *microchip* estático (células com o interior cinza) após 96 h. Escala: 100 μ m.

Fonte: Autoria própria.

Pode-se inferir que a perfusão de meio de cultura durante 96 h foi fundamental para a sobrevivência celular, visto que as células que ficaram no *microchip* sem perfusão (estático) aparentam estarem mortas.

A avaliação das alterações celulares e da capacidade de sobrevivência após permanência no *microchip* (não-tratado) também foi realizada. Para isso, as células mantidas sob perfusão (Figura 13), assim como as do controle estático (Figura 14), foram retiradas do *microchip* e transferidas para uma placa de poliestireno. As células foram avaliadas quanto à sua capacidade de crescimento e modificação das características morfológicas.

Figura 13 - Células provenientes do *microchip* (não-tratado) perfundido por 96 h e transferidas para uma placa de cultura celular de poliestireno com 24 poços. **t 0**: células na placa imediatamente após abertura do *microchip*. Tempos 24 (**t 24**), 48 (**t 48**), 72 (**t 72**) e 96 h (**t 96**) após a deposição das células em placa. Escala: 100 μ m.

Fonte: Autoria própria.

Vinte e quatro horas após terem sido transferidas para uma placa de cultura, foi possível observar que as células que se apresentavam em formato esférico no interior do *microchip* passaram a se apresentar aderentes e em formato alongado, bem como visualizadas em condições normais sob cultivo em frascos de cultura de poliestireno. Logo, demonstra-se que o material do *microchip* (poliéster) não estava sendo adequado para que as células ficassem no seu formato original. Sugere-se, portanto, que a superfície do material do *microchip* não possui as características ideais para a expressão de moléculas de adesão pelas células. A Figura 14 apresenta as características das células retiradas dos *microchips* (não-tratados) estáticos e depositadas nos poços de uma placa de cultura celular de poliestireno.

Figura 14 - Células provenientes do *microchip* estático (não-tratado) cultivadas por 96 h e transferidas para uma placa de cultura de células de poliestireno com 24 poços. **t 0**: células na placa imediatamente após abertura do *microchip*. Tempos 24 (**t 24**), 48 (**t 48**), 72 (**t 72**) e 96 h (**t 96**) na placa. Escala: 100 μ m.

Fonte: Autoria própria.

Após analisar os diversos tempos de permanência das células provenientes do *microchip* estático na placa de cultura celular, não se observou alteração na morfologia das células e nem em sua aderência, fatores que sugerem que as células estavam mortas. Comparando-se esse fato com o observado com o *microchip* perfundido, pode-se afirmar a importância do fluxo constante de meio de cultura para a manutenção e sobrevivência celular durante todo o tempo do ensaio.

O teste de MTT para avaliação da viabilidade das células contidas nos *microchips* (não-tratados) estático e dinâmico está apresentado na Figura 15.

Figura 15 - Teste de MTT para avaliação da viabilidade das células HUVEC após vários tempos de permanência no *microchip* de PT (não-tratado) com e sem perfusão. Resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão de células viáveis (%).

Fonte: Autoria própria.

Os resultados obtidos a partir do teste MTT evidenciam que a perfusão é essencial para a sobrevivência celular no interior do *microchip*.

4.5 Observação da confluência

Foram preparadas duas suspensões celulares em meio de cultura RPMI completo, sendo uma a 5×10^6 HUVEC/mL e outra a 1×10^7 HUVEC/mL. Essas suspensões foram utilizadas para injetar *microchips* de PT, sendo um microfluídico e outro estático. Além disso, 50 μ L de cada suspensão foi adicionada aos poços de uma placa de 24 poços, sendo adicionado a esses, 500 μ L de meio RPMI completo. As placas foram incubadas em estufa a 37 °C e 5% de CO₂ por 24 h. A confluência das células nos *microchips* (não-tratados) (Figuras 16 e 17) foi comparada com a das cavidades da placa (Figura 18).

Figura 16 - Células HUVEC no interior do *microchip* de PT (não-tratado) estático. (A) *Microchip* estático com 5×10^6 céls/mL – tempo zero. (B) *Microchip* estático com 5×10^6 céls/mL – tempo 24 h. (C) *Microchip* estático com 1×10^7 céls/mL – tempo zero. (D) *Microchip* estático com 1×10^7 céls/mL – tempo 24 h. Escala: 100 μ m.

Fonte: Autoria própria.

Figura 17 - HUVEC no interior do *microchip* de PT (não-tratado) fluídico. (A) *Microchip* fluídico com 5×10^6 céls/mL – tempo zero. (B) *Microchip* fluídico com 5×10^6 céls/mL – tempo 24 h. (C) *Microchip* fluídico com 1×10^7 céls/mL – tempo zero. (D) *Microchip* fluídico com 1×10^7 céls/mL – tempo 24 h. Escala: 100 μ m.

Fonte: Autoria própria.

Figura 18 - HUVEC em placa de poliestireno. (A) Poço com 5×10^6 céls/mL – tempo zero. (B) Poço com 5×10^6 céls/mL – tempo 24 h. (C) Poço com 1×10^7 céls/mL – tempo zero. (D) Poço com 1×10^7 céls/mL – tempo 24 h. Escala: 100 μ m.

Fonte: Autoria própria.

Ao analisar as imagens no tempo zero e 24 h, pode-se inferir que as células contidas no interior dos *microchips* não possuem a mesma taxa de confluência que àquela apresentada na placa de cultura, fato esse provavelmente explicado pelas características da superfície do poliéster não tratado.

4.6 Determinação de VEGF-A por ensaio imunoenzimático

A produção de VEGF-A, um fator constitutivamente produzido pelas células endoteliais, foi verificada no sobrenadante resultante da perfusão dos *microchips* de PT (não-tratados) preenchidos com HUVEC e comparada à produção em placa. Os resultados são apresentados na Figura 19.

Figura 19 - Ensaio de detecção da produção de VEGF-A pelas células HUVEC no sobrenadante de perfusão do *microchip* (não-tratado) e em placa de poliestireno. Células injetadas no *microchip* e adicionadas aos orifícios da placa: 5×10^6 céls/mL. Resultados apresentados como média $\pm$ desvio padrão.

Fonte: Autoria própria.

Ao analisar os resultados de produção de VEGF-A, verifica-se que no sobrenadante do *microchip* (não-tratado) houve uma diminuição gradativa de sua expressão ao longo do experimento. Por outro lado, a expressão de VEGF-A aumentou gradativamente, dependente do tempo, pelas células cultivadas na placa de poliestireno, sendo possível observar, também, que tal produção foi maior nessa condição quando comparada com a do *microchip*. Esses achados sugerem mais uma vez que o material da placa favorece as condições celulares, e por isso há um aumento da produção deste fator para proporcionar a multiplicação celular. As menores concentrações de VEGF-A, observadas nos maiores intervalos de tempos

experimentais (72 e 96 h) para o *microchip*, pode estar relacionada à morte celular, devido ao não favorecimento da superfície do poliéster nativo para a aderência celular.

4.7 Tratamento da superfície dos filmes de poliéster

A fim de melhorar a adesão celular, tratou-se os filmes de poliéster com plasma RF de O_2 após a impressão dos *layouts* do *microchip*. Como demonstrado na Figura 20, a exposição dos filmes de poliéster ao plasma provocou grandes alterações na superfície desse material. A diferença média de rugosidade (RMS) observada entre a superfície sem e com exposição ao plasma foi de 16,5 nm. É bem descrito na literatura que superfícies mais rugosas viabilizam a adesão e proliferação celular (33,36,41,42).

Figura 20 - Imagens de AFM (50 x 50 μm) mostrando diferenças na topografia dos filmes de poliéster sem tratamento (A) e tratado com plasma de oxigênio (B).

Fonte: Autoria própria.

Energia livre e rugosidade de uma superfície são fatores que influenciam no crescimento, adesão e diferenciação celular. Bem como mostrado na Figura 21, a modificação da superfície do poliéster, após exposição ao plasma de O_2 , resultou em um aumento considerável da componente polar (γ_s^p) da energia livre de superfície, passando de 18,4 $mJ m^{-2}$ (poliéster sem tratamento) para 60,9 $mJ m^{-2}$. Supõe-se, por conseguinte, que o tratamento com plasma induz modificações químicas na superfície dos filmes de poliéster, produzindo grupos hidrofílicos/polares (34,42).

Figura 21 – Avaliação da energia livre de superfície dos filmes de poliéster nativo e tratado com plasma RF O₂. O filme de poliéster nativo apresenta uma componente polar de 18,4 (mJ m⁻²), ao passo que essa é elevada para 60,9 (mJ m⁻²) após a exposição do filme ao plasma. γ_s : Energia livre de superfície. γ_s^d : Componente dispersiva. γ_s^p : componente polar. O erro estimado para as medidas de ângulo de contato foi de $\pm 3^\circ$ para 3 medidas independentes.

Fonte: Autoria própria.

As Figuras 22 e 23 apresentam o aspecto morfológico das HUVEC em diversos períodos de tempo no *microchip* confeccionado com filme de poliéster tratado com plasma de oxigênio.

Figura 22 - *Microchip* de PT, tratado com plasma de oxigênio, fluídico (perfundido com meio de cultura RPMI suplementado com 20% de SFB e adicionado de mix de antibióticos e antifúngicos). Tempo zero (**t 0**), 24 (**t 24**), 48 (**t 48**), 72 (**t 72**), 96 (**t 96**) e 120 (**t 120**) horas de perfusão do *microchip*. Concentração celular: 10^7 céls/mL. Escala: 100 μ m. As setas indicam células em processo de alongamento ou já alongadas.

Fonte: Autoria própria.

Figura 23 - *Microchip* de PT, tratado com plasma de oxigênio, estático. Tempo zero (**t 0**) e 120 (**t 120**) horas de perfusão do *microchip*. Concentração celular: 10^7 céls/mL. Escala: 100 μ m.

Fonte: Autoria própria.

Ao analisar as imagens da Figura 22, pode-se observar que no *microchip* tratado com plasma de oxigênio e perfundido com meio de cultura, algumas das HUVEC injetadas retomaram o aspecto morfológico típico daquele observado quando essas são cultivadas em garrafas e placas de poliestireno. Tal fato evidencia que o tratamento do poliéster com plasma de oxigênio propicia uma superfície que permite uma melhor aderência celular e, com isso, as células retomaram o formato alongado. Embora no t120 pareça que as células tenham retornado ao formato esférico, sugere-se que isso seja decorrente da falta de espaço para crescimento no microcanal. Entretanto, ao analisar o *microchip* estático (Figura 23), ou seja, que permaneceu sem perfusão durante todo o ensaio, não observa-se a transformação morfológica das células (esférico → alongado), sugerindo que o fluxo possa ter influência sobre este aspecto. Ademais, foi possível observar que em alguns *microchips* tratados e perfundidos nem todas as células adquiriram o formato alongado, não sendo observada uma total confluência no microcanal do dispositivo. Desse modo, quando a superfície é tratada com plasma de O₂ e fibronectina observa-se maior adesão celular, resultado em acordo com aqueles relatados por Storm *et al.*, e Pompe *et al.*, (43,44).

Sabe-se que as células são inerentemente sensíveis a estímulos físicos, bioquímicos e químicos presentes no microambiente (42,45). *In vivo* as células estão em contato direto com a matriz extracelular (MEC) — formada a partir de uma ligação complexa de proteínas, glicoproteínas e proteoglicanas. A MEC fornece não somente um suporte estrutural, mas também contém um reservatório de motivos de sinalização celular e fatores de crescimento que orientam a adesão e o comportamento das células. O microambiente celular fornece estímulos ambientais definidos que determinam o comportamento específico da célula, incluindo o recrutamento seletivo, a proliferação, a diferenciação e a produção de inúmeras proteínas necessárias para a organização hierárquica do tecido (46,47).

A MEC pode ser composta de várias macromoléculas (por exemplo: proteínas fibrilares, tais como colágeno e glicoproteínas) em diferentes concentrações, que interagem com proteínas da superfície celular e macromoléculas solúveis, ao exemplo de fatores de crescimento. A organização, a densidade, a geometria espacial e a bioquímica desses componentes da MEC determinam a força mecânica, a resposta celular, a aderência e a organização hierárquica do tecido (46).

Proteínas derivadas da MEC, como colágeno, fibronectina, laminina e vitronectina, são descritas como facilitadoras da adesão de vários tipos celulares por possuírem sítios de reconhecimento biológicos intrínsecos para células, via receptores de integrina. Por conseguinte, no intuito de mimetizar uma matriz extracelular para melhorar a aderência celular e com isso proporcionar as condições ideais para que as células assumam a sua morfologia nativa (alongada), promovendo a endotelização do dispositivo, esse foi tratado com uma solução de fibronectina (*Fibronectin from bovine plasma* – Sigma-Aldrich) na concentração de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$. A Figura 24 apresenta as células no interior do *microchip* tratado com fibronectina (46,48).

Figura 24 - *Microchip* de PT tratado com plasma de oxigênio e fibronectina ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$). Tempo zero (**t 0**). 6 h após injeção das células no *microchip* (**t 6**). (**t 24**) 24 h e (**t 120**) 120 h de perfusão de meio de cultura por bomba de seringa a uma vazão de $2 \mu\text{L min}^{-1}$. Escala: $100 \mu\text{m}$.

Fonte: Autoria própria.

Na Figura 24, observa-se que as algumas células após 6 h da injeção no *microchip* e 24 h de perfusão de meio de cultura projetam prolongamentos citoplasmáticos em direção a outras (t 6) e que várias células passaram do formato arredondado (t 0) para o alongado, aproximando-se do encontrado quando cultivadas em placas ou garrafas de poliestireno. Entretanto, quando o *microchip* não é perfundido com meio de cultura, perde-se, em 24 h, a morfologia celular alongada observada nas primeiras 6 h, apresentando as células em formato arredondado (Figura 25). Isso demonstra que o tratamento com fibronectina favorece a aderência celular no *microchip*, sendo fundamental que o dispositivo seja mantido sob fluxo constante de meio de cultura.

Figura 25 - *Microchip* de PT tratado com plasma de oxigênio e fibronectina ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$), não perfundido com meio de cultura e mantido em estufa a 37°C e 5% de CO_2 por 24 h. Escala: $100 \mu\text{m}$.

Fonte: Autoria própria.

Alguns ensaios também foram realizados tratando o *microchip* apenas com fibronectina. Contudo, o resultado mostrou que as células não passam do formato arredondado para o alongado, demonstrando que é preciso haver a associação do tratamento com plasma de oxigênio e fibronectina para que a adesão celular seja eficiente.

Com o intuito de aumentar a adesão celular e a confluência, as células foram ressuspendidas em meio de cultura RPMI suplementado com 20% de SFB, “mix” de antibióticos/antifúngicos e adicionado de MgCl_2 e MnCl_2 , e então, injetadas nos *microchips* tratados com plasma de oxigênio e fibronectina e perfundidos com meio RPMI suplementado. A Figura 26 apresenta as células no interior do *microchip* após o tratamento descrito.

Figura 26 - *Microchip* de PT tratado com plasma de oxigênio e fibronectina ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) e injetado com células em meio RPMI suplementado e adicionado de 1 mmol L^{-1} de MgCl_2 e 1 mol L^{-1} de MnCl_2 . Tempo zero (**t 0**). 6 h após injeção das células no *microchip* (**t 6**). 24 h (**t 24**) de perfusão com bomba de seringa a uma vazão de $2 \mu\text{L min}^{-1}$. Escala: $100 \mu\text{m}$.

Fonte: Autoria própria.

Comparando-se a Figura 26 com a 24, no período de 24 h de perfusão com o meio de cultura adicionado de MgCl_2 e MnCl_2 , existem mais células em formato alongado e também um aumento da concentração celular, visto que após 24 h de perfusão o microcanal do dispositivo estava completamente preenchido por células (Figura 27), o que demonstra, principalmente, a importância do magnésio e do manganês para a adesão e proliferação celular.

Figura 27 - *Microchip* de PT tratado com plasma de oxigênio e fibronectina ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) e injetado com células em meio RPMI suplementado e adicionado de 1 mmol L^{-1} de MgCl_2 e 1 mol L^{-1} de MnCl_2 . 24 h (t 24) de perfusão com bomba de seringa a uma vazão de $2 \mu\text{L min}^{-1}$. (A) Escala: $100 \mu\text{m}$. (B) aumento de 40x.

Fonte: Autoria própria.

As integrinas, uma família de moléculas de superfície celular, medeiam interações adesivas com a MEC, ativando vias intracelulares importantes para muitos processos biológicos, incluindo a adesão e diferenciação (39,49). Além disso, algumas funções das integrinas são dependentes da interação com cátions divalentes, tais como cálcio, magnésio e manganês, por meio de sítios de adesão metal-dependente (*Metal Ion Dependent Adhesion Site* - MIDAS) e MIDAS-like motives(50,51), sendo o magnésio o mais importante para a adesão celular por aumentar a afinidade das integrinas por ligantes da MEC (52).

Os testes com vitronectina não produziram resultados satisfatórios e, ademais, devido ao custo da fibronectina ser inferior ao da vitronectina, padronizou-se o uso de fibronectina para tratar e sensibilizar os *microchips* para melhorar a adesão celular.

A viabilidade das células cultivadas no interior do *microchip* tratado com plasma de oxigênio e fibronectina foi analisada pelo ensaio de MTT e o resultado encontra-se na Figura 28.

Figura 28 - Teste de MTT para avaliação da viabilidade das células HUVEC após vários tempos de permanência no *microchip* de PT (tratados com plasma de oxigênio e fibronectina) com ou sem perfusão. Controle negativo: meio RPMI completo. Controle positivo: SDS 1%. Resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão de células viáveis (%).

Fonte: Autoria própria.

Observa-se a partir dos resultados apresentados na Figura 28 que a perfusão constante de meio de cultura manteve as células vivas e viáveis, ou seja, ela é determinante para a sobrevivência celular no interior do *microchip*. Em contrapartida, a não perfusão do *microchip* induz a morte celular, possivelmente em decorrência da supressão de nutrientes.

O VEGF-A também foi dosado no sobrenadante proveniente da perfusão dos *microchips* i) não tratados com plasma de O₂ e perfundidos; ii) tratados com plasma de O₂ e perfundidos; iii) tratados com plasma de O₂ e fibronectina e perfundidos e iv) placas de cultura de poliestireno, para verificação da influência do tratamento do material do *microchip* sobre a adesão celular. O resultado é apresentado na Figura 29.

Figura 29 - Níveis de produção de VEGF-A pelas células HUVEC nos sobrenadantes de perfusão do *microchip* sob diferentes tratamentos e no sobrenadante de cultura de células em placa de poliestireno. Concentração celular no *microchip* e na placa: 1×10^7 céls/mL. Resultados apresentados como média $\pm$ desvio padrão. Testes de ANOVA e Tukey para comparações múltiplas. Diferenças estatisticamente significativas são representadas por letras sobre as barras. * $p < 0,05$ comparado com o *microchip* não-tratado.

Fonte: Autoria própria.

O objetivo de produzir um *microchip* utilizando materiais alternativos e baratos, que pudesse funcionar como plataforma de ensaios, foi alcançado. Assim, com a cultura no *microchip* de PT estabelecida deu-se prosseguimento aos ensaios de avaliação da toxicidade das NPs TiO₂, conforme observamos no teste de MTT na Figura 30.

Figura 30 - Teste de MTT para avaliação da viabilidade das HUVEC após exposição a diferentes concentrações de NPs TiO₂ (100, 50, 25, 20, 10, 5 µg mL⁻¹). C- (controle negativo: meio de cultura). C+ (controle positivo: SDS 1%). Células por orifício da placa: 5 x 10⁵. Condições: 24 h, 37 °C e 5% de CO₂. Resultados expressos como média ± desvio padrão de células viáveis.

Fonte: Autoria própria.

O teste de viabilidade celular (MTT) das células HUVEC frente as NPs TiO₂ revelou que as concentrações utilizadas no teste não foram capazes de produzir uma morte celular significativa.

As proteínas presentes no lisado de células HUVEC provenientes do *microchip* e da placa de cultura, submetidas a várias concentrações de NPs TiO₂, foram avaliadas por eletroforese. O resultado está apresentado na Figura 31.

Figura 31 - Perfil protéico do lisado de células HUVEC cultivadas no *microchip* e na placa e tratadas com NPs TiO₂. Canaletas 1, 3, 5, 7, 9: células cultivadas no *microchip*. Canaletas 2, 4, 6, 8, 10: células cultivadas na placa. 9-10: controle sem tratamento com NPs TiO₂.

Fonte: Autoria própria.

Os resultados mostram que existem diferenças no perfil eletroforético entre as concentrações de NPs TiO₂, a que as amostras foram submetidas, e também, quanto ao sistema de cultivo utilizado, dinâmico ou estático. Esses achados sugerem que também serão encontradas diferenças de expressão proteica quando estas amostras forem analisadas por espectrometria de massas, em uma etapa futura a ser desenvolvida.

4.8 Perfusão dos *microchips* de PT com diversas concentrações de NPs TiO₂

A figura 32 apresenta as imagens de microscopia dos *microchips* de PT preenchidos com HUVEC que foram perfundidos com várias concentrações de NPs TiO₂ (5, 10, 20, 25, 50, 100 µg mL⁻¹) com bomba de seringa à uma vazão de 2 µL min⁻¹ por 24 h.

Figura 32 - Interior do canal dos *microchips* de PT preenchidos com células HUVEC expostas às várias concentrações de NPs TiO₂ e perfundidas com bomba de seringa a uma vazão de 2 $\mu\text{L min}^{-1}$ por 24 h. **A:** células HUVEC não expostas às NPs TiO₂. **B:** HUVEC expostas à 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de NPs TiO₂. **C:** HUVEC expostas à 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de NPs TiO₂. **D:** HUVEC expostas à 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de NPs TiO₂. **E:** HUVEC expostas à 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de NPs TiO₂. **F:** HUVEC expostas à 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de NPs TiO₂. **G:** HUVEC expostas à 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de NPs TiO₂. Aumento de 40x.

Fonte: Autoria própria.

Pode-se observar na Figura 32 que o aumento da concentração NPs TiO₂ produz um descolamento celular, diminuindo o número de células no canal do *microchip*, principalmente

nos *microchips* perfundidos com 25, 50 e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de NPs TiO_2 . O mesmo comportamento celular foi observado nas células cultivadas no sistema estático (placa). Pode-se sugerir que o descolamento das células esteja ligado à citotoxicidade produzida pelas NPs TiO_2 levando à morte celular. Tais resultados também sugerem uma diminuição da proliferação celular.

4.9 Determinação de VEGF-A por ensaio imunoenzimático (ELISA)

Após a exposição das células HUVEC, nos sistemas estático e dinâmico às diferentes concentrações de NPs TiO_2 , dosou-se a concentração de VEGF no sobrenadante das culturas celulares. A figura 33 apresenta as concentrações de VEGF obtidas.

Figura 33 - Concentração de VEGF-A no sobrenadante das células HUVEC submetidas a diversas concentrações de NPs TiO_2 (em $\mu\text{g mL}^{-1}$) no *microchip* de PT e em placa de poliestireno. C-: células não submetidas ao contato com NPs TiO_2 . C+: células submetidas ao contato com $\text{TNF-}\alpha$ (10 ng mL^{-1}). Células injetadas no *microchip* e adicionadas aos orifícios da placa: 5×10^6 céls/mL. Resultados apresentados como média $\pm$ desvio padrão.

Fonte: Autoria própria.

Pode-se observar na Figura 33 que a exposição das células HUVEC às NPs TiO₂ aumentou progressivamente a concentração de VEGF até 20 µg mL⁻¹ de NPs TiO₂, tanto no sistema estático quanto no dinâmico. Montiel-Dávalos e colegas (24) relataram que a exposição de células endoteliais à NPs TiO₂ induzem, dentre várias proteínas, um aumento na expressão de VEGF, relacionado à regulação da homeostase e aos efeitos patológicos nessas células, indicando que as nanopartículas em questão são capazes de induzir uma forte resposta inflamatória além de efeitos citotóxicos. Esses resultados são suportados por vários estudos *in vivo* que demonstraram um efeito inflamatório induzido por NPs TiO₂, tais como dilatação, aumento do rolamento de leucócitos, adesão nas paredes das vênulas e estresse oxidativo na parede microvascular em ratos expostos à NPs TiO₂ (24).

A partir da concentração de 25 µg mL⁻¹ de NPs TiO₂, observa-se uma redução na concentração de VEGF, sugerindo que de acordo com alguns estudos relacionados com NPs na literatura (53) esteja ocorrendo uma diminuição da viabilidade celular, e também, um aumento da taxa de apoptose de um modo dose-dependente da concentração de NPs TiO₂. Os resultados também sugerem que a partir de uma determinada concentração, as NPs TiO₂ inibem a vasculogênese através de redução da expressão de VEGF e da indução de apoptose.

4.10 Avaliação da produção de ânion superóxido *in situ*

A figura 34 apresenta as micrografias das HUVEC submetidas aos controles positivo (TNF-α) e negativos (meio de cultura e 0,1 % de DMSO – concentração utilizada para a diluição dos corantes) no sistema estático (lâminas) e coradas com os corantes fluorescentes DHE e MitoSox, para verificação da produção espontânea de ânion superóxido.

Figura 34 - Células HUVEC cultivadas em lâminas de 8 cavidades (controle estático) coradas com corantes fluorescentes para avaliação da produção espontânea de ânion superóxido. **A:** controle positivo (células estimuladas com TNF- α por 24 h) coradas com DHE. **B:** controle positivo (células estimuladas com TNF- α por 24 h) coradas com MitoSox. **C:** controle negativo (células expostas somente ao meio de cultura por 24 h) coradas com DHE. **D:** controle negativo (células expostas somente ao meio de cultura por 24 h) coradas com MitoSox. **E:** controle negativo (células expostas à 0,1% de DMSO – concentração de diluição dos corantes, por 24 h) coradas com DHE. **F:** controle negativo (células expostas à 0,1% de DMSO, por 24 h) coradas com MitoSox. Núcleos corados com DAPI (azul). Aumento 200 x.

Fonte: Autoria própria.

Na figura 34, as áreas vermelhas nas células em **A**, representam o DHE oxidado e em **B** marcação das mitocôndrias com MitoSOX, representando a geração de superóxido. As imagens aqui apresentadas são representativas de três experimentos independentes.

Observa-se, ao analisar essas micrografias, que o controle positivo (TNF- α) foi capaz de induzir a produção de ânions superóxido (figuras 34**A** e 34**B**). O corante DHE é sensível às espécies reativas de oxigênio, em particular, ao ânion superóxido (54). O MitoSox é um corante capaz de indicar especificamente a produção de ânion superóxido pelas mitocôndrias de células vivas. As figuras 34 **C**, **D**, **E** e **F** demonstram que não se observa produção espontânea de ânions superóxido pelas células expostas somente ao meio de cultura e nem há estímulo por parte do DMSO, uma vez que esse foi utilizado para diluir os corantes, conforme indicação do fabricante.

A figura 35 apresenta as fotos das células HUVEC, obtidas por microscopia de fluorescência, submetidas ao contato com várias concentrações de NPs TiO₂ no sistema estático (lâminas).

Figura 35 - Células HUVEC cultivadas em lâminas de 8 cavidades (controle estático) coradas com corantes fluorescentes para avaliação da produção de ânion superóxido mediante exposição às NPs TiO₂. **A:** HUVEC expostas à 5 µg mL⁻¹ de NPs TiO₂ por 24 h e coradas com DHE. **B:** HUVEC expostas à 5 µg mL⁻¹ de NPs TiO₂ por 24 h e coradas com MitoSox. **C:** HUVEC expostas à 10 µg mL⁻¹ de NPs TiO₂ por 24 h e coradas com DHE. **D:** HUVEC expostas à 10 µg mL⁻¹ de NPs TiO₂ por 24 h e coradas com MitoSox. **E:** HUVEC expostas à 20 µg mL⁻¹ de NPs TiO₂ por 24 h e coradas com DHE. **F:** HUVEC expostas à 20 µg mL⁻¹ de NPs TiO₂ por 24 h e coradas com MitoSox. **G:** HUVEC expostas à 25 µg mL⁻¹ de NPs TiO₂ por 24 h e coradas com DHE. **H:** HUVEC expostas à 25 µg mL⁻¹ de NPs TiO₂ por 24 h e coradas com MitoSox. **I:** HUVEC expostas à 50 µg mL⁻¹ de NPs TiO₂ por 24 h e coradas com DHE. **J:** HUVEC expostas à 50 µg mL⁻¹ de NPs TiO₂ por 24 h e coradas com MitoSox. **K:** HUVEC expostas à 100 µg mL⁻¹ de NPs TiO₂ por 24 h e coradas com DHE. **L:** HUVEC expostas à 100 µg mL⁻¹ de NPs TiO₂ por 24 h e coradas com MitoSox. Núcleos corados com DAPI (azul). Aumento 200x.

Fonte: Autoria própria.

A figura 36 apresenta as micrografias das células HUVEC, obtidas por microscopia de fluorescência, submetidas ao contato com várias concentrações de NPs TiO₂ no sistema dinâmico (*microchips* de PT).

Figura 36 - Células HUVEC cultivadas em *microchips* de PT (controle dinâmico) coradas com corantes fluorescentes para avaliação da produção de ânion superóxido mediante exposição às NPs TiO₂. **A:** controle negativo: HUVEC expostas ao meio de cultura por 24 h coradas com DHE. **B:** controle negativo: HUVEC expostas ao meio de cultura por 24 h coradas com MitoSox. **C:** HUVEC expostas à 5 µg mL⁻¹ de NPs TiO₂ por 24 h e coradas com DHE. **D:** HUVEC expostas à 5 µg mL⁻¹ de NPs TiO₂ por 24 h e coradas com MitoSox. **E:** HUVEC expostas à 10 µg mL⁻¹ de NPs TiO₂ por 24 h e coradas com DHE. **F:** HUVEC expostas à 10 µg mL⁻¹ de NPs TiO₂ por 24 h e coradas com MitoSox. **G:** HUVEC expostas à 20 µg mL⁻¹ de NPs TiO₂ por 24 h e coradas com DHE. **H:** HUVEC expostas à 20 µg mL⁻¹ de NPs TiO₂ por 24 h e coradas com MitoSox. **I:** HUVEC expostas à 25 µg mL⁻¹ de NPs TiO₂ por 24 h e coradas com DHE. **J:** HUVEC expostas à 25 µg mL⁻¹ de NPs TiO₂ por 24 h e coradas com MitoSox. **K:** HUVEC expostas à 50 µg mL⁻¹ de NPs TiO₂ por 24 h e coradas com DHE. **L:** HUVEC expostas à 50 µg mL⁻¹ de NPs TiO₂ por 24 h e coradas com MitoSox. **M:** HUVEC expostas à 100 µg mL⁻¹ de NPs TiO₂ por 24 h e coradas com DHE. **N:** HUVEC expostas à 100 µg mL⁻¹ de NPs TiO₂ por 24 h e coradas com MitoSox. Núcleos corados com DAPI (azul). Aumento 200x.

Fonte: Autoria própria.

Analisando as figuras 35 e 36, que apresentam a produção de ânion superóxido nos sistemas estático (controle) e dinâmico, respectivamente, observa-se que em ambas ocorrem

a produção de ânion superóxido após o contato com as NPs TiO_2 . Entretanto, as células contidas no *microchip* de PT mostram sinais mais intensos dessa produção nas concentrações mais inferiores, quando comparado com as contidas na lâmina, nas quais os sinais também estão presentes, porém de forma mais discreta. Logo, sugere-se que essa diferença possa estar associada à tensão de cisalhamento imposta às células submetidas ao sistema dinâmico.

O estresse oxidativo é um evento crítico de inflamação endotelial, ativação e disfunção. Uma resposta inflamatória é caracterizada por grandes aumentos em ROS, NO, e citocinas inflamatórias (55). Assim como observado por Montiel-Dávalos e colaboradores (24), o efeito citotóxico induzido pelas NPs TiO_2 em HUVEC está associado com um grande aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e óxido nítrico (NO) (26). Resultados similares também foram observados em hepatócitos humanos e células epiteliais, nos quais as NPs TiO_2 induziram uma diminuição na viabilidade e um aumento de EROs (28). Em estudos com células PC12 observou-se um acúmulo intracelular de EROs e apoptose (56). Em cultura de células BEAS-2B, as NPs TiO_2 induziram estresse oxidativo e apoptose. A apoptose geralmente ocorre quando há uma destruição do ambiente interno, e as EROs são um fator importante neste processo, visto que a excessiva geração de EROs induz a permeabilidade da membrana mitocondrial e danifica a cadeia respiratória, culminando por desencadear o processo de apoptose (26).

4.11 Avaliação do processo de morte celular *in situ* com Laranja de Acridina e Brometo de Etídio

Após 24 h do contato com as NPs TiO_2 as HUVEC, contidas tanto nos *microchips* (sistema dinâmico) quanto nas lâminas (sistema estático), foram coradas com laranja de acridina (LA) e brometo de etídio (BE), para avaliação dos efeitos nas células quanto à morte celular. A Figura 37 apresenta as micrografias obtidas por microscopia de fluorescência das HUVEC cultivadas nas lâminas (sistema estático).

Figura 37 - Células HUVEC em lâmina (sistema estático) após exposição de 24 h a várias concentrações de NPs TiO_2 coradas com laranja de acridina e brometo de etídio. **A**: controle negativo (células não expostas às NPs TiO_2). **B**: controle positivo (células expostas ao $\text{TNF-}\alpha$). **C**: HUVEC expostas à $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de NPs TiO_2 . **D**: HUVEC expostas à $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ de NPs TiO_2 . **E**: HUVEC expostas à $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ de NPs TiO_2 . **F**: HUVEC expostas à $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ de NPs TiO_2 . **G**: HUVEC expostas à $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ de NPs TiO_2 . **H**: HUVEC expostas à $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ de NPs TiO_2 . Aumento de 100x.

Fonte: Autoria própria.

A Figura 38 apresenta os gráficos que discriminam as porcentagens de células HUVEC viáveis, apoptóticas ou necróticas em cada uma das concentrações de NPs TiO₂ testadas no sistema estático (lâmina).

Figura 38 - Porcentagem de células HUVEC vivas, em apoptose (precoce e tardia) e em necrose, submetidas às concentrações de NPs TiO₂ testadas na lâmina e coradas com laranja de acridina e brometo de etídio. **A:** controle negativo (células não expostas às NPs TiO₂). **B:** controle positivo (células expostas ao TNF- α). **C:** HUVEC expostas à 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de NPs TiO₂. **D:** HUVEC expostas à 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de NPs TiO₂. **E:** HUVEC expostas à 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de NPs TiO₂. **F:** HUVEC expostas à 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de NPs TiO₂. **G:** HUVEC expostas à 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de NPs TiO₂. **H:** HUVEC expostas à 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de NPs TiO₂.

Fonte: Autoria própria.

Como resultados da exposição das HUVEC às NPs TiO₂ no sistema estático (lâminas), observa-se a predominância das células no estágio de apoptose, sendo a medida com que se aumenta a concentração das NPs TiO₂ observa-se um aumento de células em apoptose tardia e diminuição da precoce.

Explica-se a coloração das células em apoptose precoce pela capacidade do corante laranja de acridina em se ligar aos ácidos nucleicos, RNA e DNA. Desse modo, em condições apoptóticas iniciais, em particular induzidas neste estudo pelo contato com as NPs TiO₂, ocorre a ativação do núcleo e esse, por sua vez, torna-se mais ácido podendo apresentar coloração amarela, alaranjada ou vermelha, dependendo da concentração de RNA, cujo aumento na produção resulta da ativação nuclear. Como inicialmente ainda existe baixa concentração de RNA no citoplasma, esse adquire a coloração em verde. Quando a apoptose passa para a fase tardia, ocorre o aumento da concentração de RNA no citoplasma e no núcleo. Além de ocorrerem modificações físico-químicas em várias organelas (principalmente lisossomos) e essas tornarem-se ácidas, tanto o núcleo e o citoplasma são corados na cor laranja. Toda via, quando os danos celulares são capazes de alcançar a membrana e desestabilizá-la, corantes com moléculas de tamanho maior, como é o caso do brometo de etídio, penetram na célula e a sua reação com o DNA fluoresce em vermelho, sinalizando o processo de necrose (57).

O termo apoptose ou “morte celular programada” foi inicialmente cunhado em 1972 por Kerr, Wyllie e Currie para caracterizar um determinado aspecto morfológico de morte celular. Desde então, métodos que avaliam características morfológicas para a determinação da presença de células apoptóticas tem sido amplamente utilizados (24,25).

A apoptose também é considerada um mecanismo essencial para a manutenção da homeostase em organismos multicelulares. As cascatas de transdução de sinal que ativam a apoptose estão presentes em todas as células e são mantidas em estado inativo em condições normais. Entretanto, o programa apoptótico pode ser ativado por uma variedade de estímulos exógenos, tais como a ligação de moléculas aos receptores de membrana, ação de agentes químicos, radiação ionizante, danos ao DNA, choque térmico, privação de fatores de crescimento, baixa quantidade de nutrientes, níveis aumentados de espécies reativas de oxigênio.

De um modo geral, a apoptose é um fenômeno em que ocorre uma retração da célula,

causando a perda da aderência com a matriz extracelular e células vizinhas. A cromatina sofre condensação e se concentra junto à membrana nuclear, que se mantém intacta. Também são observadas estruturas chamadas de corpos apoptóticos. Por meio da microscopia de fluorescência é possível observar os núcleos apoptóticos menores do que os núcleos normais, com cromatina condensada, fragmentação nuclear e vacúolos intracitoplasmáticos (26,58).

No presente estudo foi possível observar a perda da aderência com a matriz extracelular e células vizinhas, presença de vacúolos intracitoplasmáticos, células arredondadas, cromatina condensada e corpos apoptóticos (58). Tais resultados estão consoantes com a literatura (24).

Em comparação com os resultados do teste de viabilidade celular (MTT) das HUVEC frente às NPs TiO₂, conforme Figura 30 (item 4.7) — em que foi mostrado que as concentrações utilizadas no teste não foram capazes de produzir uma morte celular significativa — pode-se observar que o ensaio realizado com LA/BE foi mais específico e eficiente para mostrar que as NPs TiO₂ são capazes de induzir morte celular, e ainda, discriminar essa morte em apoptose ou necrose.

Na Figura 39 são apresentadas as micrografias obtidas por microscopia de fluorescência das células contidas nos *microchips* de PT (sistema dinâmico).

Figura 39 - Células HUVEC em *microchips* (sistema dinâmico) após exposição de 24 h a várias concentrações de NPs TiO₂ coradas com laranja de acridina e brometo de etídio. **A:** controle negativo (células não expostas às NPs TiO₂). **B:** controle positivo (células expostas ao TNF- α). **C:** HUVEC expostas à 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de NPs TiO₂. **D:** HUVEC expostas à 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de NPs TiO₂. **E:** HUVEC expostas à 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de NPs TiO₂. **F:** HUVEC expostas à 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de NPs TiO₂. **G:** HUVEC expostas à 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de NPs TiO₂. **H:** HUVEC expostas à 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de NPs TiO₂. Aumento de 100x.

Fonte: Autoria própria.

Na Figura 40 são discriminadas as porcentagens de HUVEC viáveis, apoptóticas ou necróticas em cada uma das concentrações de NPs TiO₂ testadas no sistema dinâmico (*microchip*).

Figura 40 - Porcentagem de HUVEC vivas, em apoptose e em necrose, submetidas às concentrações de NPs TiO₂ testadas no *microchip* por 24 h e coradas com laranja de acridina e brometo de etídio. **A:** controle negativo (células não expostas às NPs TiO₂). **B:** controle positivo (células expostas ao TNF- α). **C:** HUVEC expostas à 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de NPs TiO₂. **D:** HUVEC expostas à 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de NPs TiO₂. **E:** HUVEC expostas à 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de NPs TiO₂. **F:** HUVEC expostas à 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de NPs TiO₂. **G:** HUVEC expostas à 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de NPs TiO₂. **H:** HUVEC expostas à 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de NPs TiO₂.

Fonte: Autoria própria.

A coloração diferencial com LA/BE, utilizada no *microchip*, demonstrou o predomínio da indução de morte celular por apoptose tardia (células alaranjadas), não sendo detectada células em apoptose precoce e nem em necrose, em comparação com o sistema estático. Esses resultados sugerem que após a perfusão do *microchip* por 24 h com diversas concentrações de NPs TiO₂, as células sofrem maiores danos em comparação às células cultivadas na lâmina (sistema estático). Provavelmente, isso se deve às tensões mecânicas de cisalhamento impostas às células cultivadas sob perfusão. Adicionalmente, as células apresentaram-se arredondadas e com condensação da cromatina. Devido às tensões de cisalhamento, nas concentrações de 50 e 100 µg mL⁻¹ de NPs TiO₂, foi possível observar uma maior diminuição do número de células aderidas ao *microchip* e às células vizinhas, quando comparadas ao sistema estático.

As imagens das células contidas nos *microchips* não são tão nítidas devido a presença de líquido (corantes fluorescentes) remanescente no microcanal e também pelo fato do poliéster não apresentar o mesmo índice de refração das lâminas de permanox™ (material das lâminas do sistema estático). Assim, as outras alterações pertinentes à apoptose não puderam ser observadas, como foi possível nas células submetidas ao sistema estático.

4.12 Avaliação do processo de morte celular *in situ* com YO-PRO-1 e Iodeto de Propídio (IP)

A confirmação do processo de morte celular foi realizada por meio dos corantes YO-PRO-1 e IP. A Figura 41 apresenta as micrografias obtidas das HUVEC cultivadas em lâminas de 8 câmaras, após exposição à diferentes concentrações de NPs TiO₂ por 24 h.

Figura 41 - HUVEC cultivadas em lâmina (sistema estático) após exposição a várias concentrações de NPs TiO₂ durante 24 h e coradas com YO-PRO-1 e IP. **A:** controle negativo (células não expostas às NPs TiO₂). **B:** controle positivo (células expostas ao TNF- α). **C:** HUVEC expostas à 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de NPs TiO₂. **D:** HUVEC expostas à 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de NPs TiO₂. **E:** HUVEC expostas à 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de NPs TiO₂. **F:** HUVEC expostas à 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de NPs TiO₂. **G:** HUVEC expostas à 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de NPs TiO₂. **H:** HUVEC expostas à 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de NPs TiO₂. Núcleos azuis corados com DAPI. Células apoptóticas coradas em verde. Células necróticas coradas em vermelho. Aumento de 40x.

Fonte: Autoria própria.

A Figura 42 apresenta as fotos obtidas das células HUVEC cultivadas nos *microchips* de PT após exposição por 24 h a diferentes concentrações de NPs TiO₂.

Figura 42 - Células HUVEC no *microchip* de PT (sistema dinâmico) após exposição por 24 h a várias concentrações de NPs TiO₂ coradas com YO-PRO-1 e IP. **A:** controle negativo (células não expostas às NPs TiO₂). **B:** controle positivo (células expostas ao TNF- α). **C:** HUVEC expostas à 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de NPs TiO₂. **D:** HUVEC expostas à 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de NPs TiO₂. **E:** HUVEC expostas à 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de NPs TiO₂. **F:** HUVEC expostas à 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de NPs TiO₂. **G:** HUVEC expostas à 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de NPs TiO₂. **H:** HUVEC expostas à 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de NPs TiO₂. Núcleos azuis corados com DAPI. Células apoptóticas coradas em verde. Células necróticas coradas em vermelho. Aumento de 40x.

Fonte: Autoria própria.

Ao comparar os resultados gerais de apoptose e necrose em cada imagem do ensaio de morte celular com YO-PRO-1/IP com o de Laranja de acridina/brometo de etídio, observa-se uma reciprocidade entre eles. Entretanto, com os corantes YO-PRO-1 e IP não foi possível a discriminação de apoptose precoce e tardia. As concentrações de NPs TiO₂ testadas nos dois sistemas foram capazes de induzir morte celular, sendo esta morte mais evidente nas células submetidas às tensões de cisalhamento no *microchip*. Logo, ao se comparar com um sistema *in vivo*, pode-se supor que o efeito das NPs TiO₂ no sistema vascular possa ser mais danoso, devido às tensões de cisalhamento imposta pela circulação sanguínea as paredes dos vasos. Desse modo, observa-se a importância de ensaios de toxicidade que levam em consideração a dinâmica do ambiente em que diferentes células se situam no organismo.

5 CONCLUSÕES

Como um novo material para biologia celular, o poliéster-toner demonstrou ser adequado para cultura de células endoteliais. O *microchip* tratado com plasma de oxigênio e fibronectina permitiu uma melhor adesão e proliferação celular, enquanto que a perfusão do *microchip* foi fundamental para a sobrevivência das células. Além disso, a microfabricação dos dispositivos mostrou-se muito prática e simples.

Vários efeitos citotóxicos foram observados nas células HUVEC após a exposição às NPs TiO₂. Os resultados de quantificação da produção de VEGF sugerem que a resposta seja dose-dependente, em que os efeitos citotóxicos das NPs TiO₂ são capazes de induzir resposta inflamatória ou inibir a vasculogênese por meio da redução da expressão de VEGF, da indução de apoptose e da diminuição da proliferação celular.

Devido ao efeito citotóxico induzido pelas NPs TiO₂ nas células HUVEC, em ambos os sistemas estático e dinâmico, pôde-se avaliar o estresse oxidativo mediante a produção de ânion superóxido, sendo no sistema dinâmico observado sinais mais proeminentes de sua produção.

Ao comparar o ensaio de morte celular com o de produção de ânion superóxido, observa-se a relação desses dois eventos. O estresse oxidativo prejudica a cadeia respiratória, desencadeando a apoptose. No ensaio de morte celular foi possível observar a influência de tensões de cisalhamento no sistema dinâmico (*microchip*), em que os danos celulares foram mais acentuados em comparação com o sistema estático. Dessa forma, destaca-se a importância de testes de toxicidade que levem em consideração a dinâmica do ambiente em que as células se apresentam no organismo.

Por fim, espera-se que os *microchips* de PT sejam utilizados em diversos laboratórios, representando uma alternativa à cultura de células tradicional. No futuro, pretende-se que essa plataforma seja preferível à utilização de modelos animais, quando for produzida como um órgãos-em-chip estruturados e a um baixo custo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 Esch, E.W.; Bahinski, A.; et al. Organs-on-chips at the frontiers of drug discovery. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 14, n. 4, p. 248–260, 2015.
- 2 Huh, D.; Hamilton, G.A.; et al. From 3D cell culture to organs-on-chips. **Trends in Cell Biology**, v. 21, n. 12, p. 745–754, 2011.
- 3 Groves, J.T. Learning the chemical language of cell-surface interactions. **Science's STKE : signal transduction knowledge environment**, v. 2005, n. 301, p. pe45, 2005.
- 4 Huh, D.; Kim, H.J.; et al. Microfabrication of human organs-on-chips. **Nature protocols**, v. 8, n. 11, p. 2135–57, 2013.
- 5 El-Ali, J.; Sorger, P.K.; et al. Cells on chips. **Nature**, v. 442, n. 7101, p. 403–411, 2006.
- 6 Hubbell, J. a Biomaterials in tissue engineering. **Biotechnology**, v. 13, n. 6, p. 565–576, 1995.
- 7 Shin, H. Fabrication methods of an engineered microenvironment for analysis of cell-biomaterial interactions. **Biomaterials**, v. 28, n. 2, p. 126–133, 2007.
- 8 Fabre, K.M.; Livingston, C.; et al. Organs-on-chips (microphysiological systems): tools to expedite efficacy and toxicity testing in human tissue. **Experimental biology and medicine**, v. 239, n. 9, p. 1073–7, 2014.
- 9 Yum, K.; Hong, S.G.; et al. Physiologically relevant organs on chips. **Biotechnology Journal**, v. 9, n. 1, p. 16–27, 2014.
- 10 Meer, A.D. Van Der; Berg, A. Van Den Organs-on-chips: breaking the in vitro impasse. **Integrative Biology**, v. 4, n. 5, p. 461, 2012.
- 11 Perestrelo, A.R.; Águas, A.C.P.; et al. Microfluidic Organ / Body-on-a-Chip Devices at the Convergence of Biology and Microengineering. **Sensors**, n. 15, p. 31142–31170, 2015.
- 12 Huh, D.; Kim, H.J.; et al. Microfabrication of human organs-on-chips. **Nature Protocols**, v. 8, n. 11, p. 2135–2157, 2013.
- 13 Kim, D.; Wu, X.; et al. Microfluidics-based in vivo mimetic systems for the study of cellular biology. **Accounts of Chemical Research**, v. 47, n. 4, p. 1165–1173, 2014.
- 14 An, F.; Qu, Y.; et al. Organ-on-a-Chip : New Platform for Biological Analysis. **Analytical Chemistry Insights**, n. 10, p. 39–45, 2015.
- 15 Thompson, B.L.; Ouyang, Y.; et al. Inexpensive, rapid prototyping of microfluidic

devices using overhead transparencies and a laser print, cut and laminate fabrication method. **Nature protocols**, v. 10, n. 6, p. 875–86, 2015.

16 Duffy, D.C.; McDonald, J.C.; et al. Rapid prototyping of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane). **Analytical Chemistry**, v. 70, n. 23, p. 4974–4984, 1998.

17 Duarte, G.R.M.; Price, C.W.; et al. Dynamic solid phase DNA extraction and PCR amplification in polyester-toner based microchip. **Analytical Chemistry**, v. 83, n. 13, p. 5182–5189, 2011.

18 Duarte, G.R.M.; Coltro, W.K.T.; et al. Disposable polyester-toner electrophoresis microchips for DNA analysis. **Journal of chromatography. A**, v. 137, n. 11, p. 220–6, 2012.

19 Zhang, W.; Choi, D.S.; et al. Studying cancer stem cell dynamics on PDMS surfaces for microfluidics device design. **Scientific reports**, v. 3, p. 2332, 2013.

20 Jang, K.-J.; Suh, K.-Y. A multi-layer microfluidic device for efficient culture and analysis of renal tubular cells. **Lab on a Chip**, v. 10, n. 1, p. 36–42, 2010.

21 Chovàn, T.; Guttman, A. Microfabricated devices in biotechnology and biochemical processing. **Trends in Biotechnology**, v. 20, n. 3, p. 116–122, 2002.

22 Cockcroft, N.Y.; Oke, O.; et al. An in vitro perfusion system to examine the responses of endothelial cells to simulated flow and inflammatory stimulation. **ATLA Alternatives to Laboratory Animals**, v. 37, n. 6, p. 657–669, 2009.

23 Lucio, C.; Dominguez, H.; et al. A Dry Process for Production of Microfluidic Devices Based on the Lamination of Laser-Printed Polyester Films. **Analytical Chemistry**, v. 75, n. 15, p. 3853–3858, 2003.

24 Montiel-Dávalos, A.; Ventura-Gallegos, J.L.; et al. TiO₂ nanoparticles induce dysfunction and activation of human endothelial cells. **Chemical research in toxicology**, v. 25, n. 4, p. 920–30, 2012.

25 Tucci, P.; Porta, G.; et al. Metabolic effects of TiO₂ nanoparticles, a common component of sunscreens and cosmetics, on human keratinocytes. **Cell death & disease**, v. 4, p. e549, 2013.

26 Yin, J.J.; Liu, J.; et al. Phototoxicity of nano titanium dioxides in HaCaT keratinocytes-Generation of reactive oxygen species and cell damage. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 263, n. 1, p. 81–88, 2012.

27 Fard, J.K.; Jafari, S.; et al. A Review of Molecular Mechanisms Involved in Toxicity

of Nanoparticles. **Tabriz University of Medical Sciences**, v. 5, n. 4, p. 447–454, 2015.

28 Hong, J.; Zhang, Y. Murine liver damage caused by exposure to nano-titanium dioxide. **Nanotechnology**, v. 27, n. 11, p. 1-14, 2016.

29 Li, W.; Zhou, J.; et al. Study of the in vitro cytotoxicity testing of medical devices. **Biomedical reports**, v. 3, n. 5, p. 617–620, 2015.

30 Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 1983.

31 Green, L.C.; Wagner, D.A.; et al. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, v. 126, n. 1, p. 131–138, 1982.

32 Chu, P.; Chen, J.; et al. Plasma-surface modification of biomaterials. **Materials Science and Engineering: R: Reports**, v. 36, n. 5–6, p. 143–206, 2002.

33 Charpentier, P.A.; Maguire, A.; et al. Surface modification of polyester to produce a bacterial cellulose-based vascular prosthetic device. **Applied Surface Science**, v. 252, n. 18, p. 6360–6367, 2006.

34 Pandiyaraj, K.N.; Deshmukh, R.R.; et al. Influence of operating parameters on surface properties of RF glow discharge oxygen plasma treated TiO₂/PET film for biomedical application. **Materials science & engineering. C, Materials for biological applications**, v. 36, p. 309–19, 2014.

35 Alves, P.; Cardoso, R.; et al. Surface modification of polyurethane films by plasma and ultraviolet light to improve hemocompatibility for artificial heart valves. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 113, p. 25–32, 2014.

36 Yang, J.; Bei, J.; et al. Enhanced cell affinity of poly (D,L-lactide) by combining plasma treatment with collagen anchorage. **Biomaterials**, v. 23, n. 12, p. 2607–2614, 2002.

37 Schulz, C.; Schafer, A.; et al. Chemokine fractalkine mediates leukocyte recruitment to inflammatory endothelial cells in flowing whole blood: A critical role for P-selectin expressed on activated platelets. **Circulation**, v. 116, n. 7, p. 764–773, 2007.

38 Lutolf, M.P.; Hubbell, J. a Synthetic biomaterials as instructive extracellular microenvironments for morphogenesis in tissue engineering. **Nature biotechnology**, v. 23, n. 1, p. 47–55, 2005.

39 Martino, M.M.; Mochizuki, M.; et al. Controlling integrin specificity and stem cell

differentiation in 2-D and 3-D environments through regulation of fibronectin domain stability. **Biomaterials**, v. 30, n. 6, p. 1089–1097, 2009.

40 Dewez, J.L.; Lhoest, J.B.; et al. Adhesion of mammalian cells to polymer surfaces: From physical chemistry of surfaces to selective adhesion on defined patterns. **Biomaterials**, v. 19, n. 16, p. 1441–1445, 1998.

41 Santos A.R., J.; Barbanti, S.H.; et al. Vero cell growth and differentiation on poly(L-lactic acid) membranes of different pore diameters. **Artificial Organs**, v. 25, n. 1, p. 7–13, 2001.

42 Chung, T.W.; Liu, D.Z.; et al. Enhancement of the growth of human endothelial cells by surface roughness at nanometer scale. **Biomaterials**, v. 24, n. 25, p. 4655–4661, 2003.

43 Storm, T.; Teske, M.; et al. Enhanced Endothelialization of PCL through chemical activation, protein precoating and VEGF stimulation. **Biomed Tech**, n. 58, v. 7, 2013.

44 Pompe, T.; Keller, K.; et al. Surface modification of poly(hydroxybutyrate) films to control cell-matrix adhesion. **Biomaterials**, v. 28, n. 1, p. 28–37, 2007.

45 Discher, D.E.; Janmey, P.; et al. Tissue Cells Feel and Respond to the Stiffness of Their Substrate. **Science**, v. 310, n. 18, p. 1139–1143, 2005.

46 Mel, A. de; Jell, G.; et al. Biofunctionalization of biomaterials for accelerated in situ endothelialization: A review. **Biomacromolecules**, v. 9, n. 11, p. 2969–2979, 2008.

47 Watt, F.M.; Hogan, B.L.M. Out of Eden: Stem Cells and Their Niches. **Science**, v. 287, n. 5457, p. 1427–1430, 2000.

48 Rosso, F.; Giordano, A.; et al. From Cell-ECM Interactions to Tissue Engineering. **Journal of Cellular Physiology**, v. 199, n. 2, p. 174–180, 2004.

49 Docheva, D.; Popov, C.; et al. Human mesenchymal stem cells in contact with their environment: Surface characteristics and the integrin system. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 11, n. 1, p. 21–38, 2007.

50 Banères, J.L.; Roquet, F.; et al. A minimized human integrin $\alpha 5 \beta 1$ that retains ligand recognition. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 8, p. 5888–5903, 2000.

51 Leitinger, B.; McDowall, A.; et al. The regulation of integrin function by Ca^{2+} . **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1498, n. 2–3, p. 91–98, 2000.

52 Shimaya, M.; Muneta, T.; et al. Magnesium enhances adherence and cartilage formation of synovial mesenchymal stem cells through integrins. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 18, n. 10, p. 1300–1309, 2010.

- 53 Reinhart-King, C. a; Dembo, M.; et al. The dynamics and mechanics of endothelial cell spreading. **Biophysical journal**, v. 89, n. 1, p. 676–689, 2005.
- 54 Nguyen, N.-T.; Shaegh, S.A.M.; et al. Design, fabrication and characterization of drug delivery systems based on lab-on-a-chip technology. **Advanced drug delivery reviews**, v. 65, n. 11–12, p. 1403–19, 2013.
- 55 Ferrara, N.; Gerber, H.-P.; et al. The biology of VEGF and its receptors. **Nature medicine**, v. 9, n. 6, p. 669–76, 2003.
- 56 Gao, H.; Dong, H.; et al. Effective Spatial Separation of PC12 and NIH3T3 Cells by the Microgrooved Surface of Biocompatible Polymer Substrates. **Langmuir**, v. 31, n. 24, p. 6797–6806, 2015.
- 57 Tanaka, Y.; Kikukawa, Y.; et al. Culture and leukocyte adhesion assay of human arterial endothelial cells in a glass microchip. **Analytical sciences**, v. 23, n. 3, p. 261–266, 2007.
- 58 Zhai, X.; Yang, Y.; et al. Inhibition of LDH-A by oxamate induces G2/M arrest, apoptosis and increases radiosensitivity in nasopharyngeal carcinoma cells. **Oncology Reports**, v. 30, n. 6, p. 2983–2991, 2013.