

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Escola de Engenharia
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Mecânica

Gabriel Santos Rosalem

**Desenvolvimento de uma nova plataforma
Organ-on-a-Chip para a biomimetização do
microambiente da medula óssea**

Belo Horizonte

2023

Gabriel Santos Rosalem

**Desenvolvimento de uma nova plataforma
Organ-on-a-Chip para a biomimetização do microambiente
da medula óssea**

Versão final

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Mecânica da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Engenharia Mecânica.

Área de concentração:

Bioengenharia

Orientador:

Prof. Estevam Barbosa de Las Casas, Dr.

Coorientadores:

Prof. Libardo Andrés Gonzales Torres, Dr.

Maria Gabriela Reis Carvalho, Dra.

Belo Horizonte

2023

R788d	<p>Rosalem, Gabriel Santos. Desenvolvimento de uma nova plataforma <i>Organ-on-a-Chip</i> para a Biomimetização do microambiente da medula óssea [recurso eletrônico] / Gabriel Santos Rosalem. - 2023. 1 recurso online (150 f. : il., color.) : pdf.</p> <p>Orientador: Estevam Barbosa de Las Casas. Coorientadores: Libardo Andrés Gonzales Torres, Maria Gabriela Reis Carvalho.</p> <p>Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Engenharia.</p> <p>Anexos: f. 146-150.</p> <p>Bibliografia: f. 125-145. Exigências do sistema: Adobe Acrobat Reader.</p> <p>1. Engenharia mecânica - Teses. 2. Bioengenharia - Teses. 3. Biomecânica - Teses. 4. Medula óssea - Teses. I. 5. Microfluídica - Teses. Las Casas, Estevam Barbosa de. II. Gonzáles-Torres, Libardo Andrés. III. Carvalho, Maria Gabriela Reis. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Engenharia. V. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDU: 621(043)</p>
-------	--



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE ENGENHARIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA MECÂNICA

FOLHA DE APROVAÇÃO

"DESENVOLVIMENTO DE UMA NOVA PLATAFORMA ORGAN-ON-A-CHIP PARA A BIOMIMETIZAÇÃO DO MICROAMBIENTE DA MEDULA ÓSSEA"

GABRIEL SANTOS ROSALEM

Tese submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Mecânica da Universidade Federal de Minas Gerais, constituída pelos Professores: Dr. Estevam Barbosa de Las Casas (Orientador – Instituto de Estudos Avançados Transdisciplinares/IEAT/UFMG), Dr. Libardo Andrés González Torres (Coorientador – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri/UFVJM), Dr^a. Maria Gabriela Reis Carvalho (Coorientadora - Fundação Oswaldo Cruz/Centro de Pesquisas René Rachou), Dr. Leandro Soares de Oliveira (Departamento de Engenharia Mecânica/UFMG), Dr. Flavio Orlando Plentz Filho (Departamento de Física/UFMG), Dr. Lionel Fernel Gamarra Contreras (Instituto Israelita Albert Einstein) e Dr. Manuel Doblare Castellano (Universidad de Zaragoza), como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de "**Doutor em Engenharia Mecânica**", na área de concentração de "Bioengenharia".

Tese aprovada no dia 19 de janeiro de 2023.



Documento assinado eletronicamente por **Estevam Barbosa de Las Casas, Diretor(a)**, em 23/01/2023, às 11:43, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Libardo Andrés González Torres, Usuário Externo**, em 24/01/2023, às 09:13, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Maria Gabriela Reis Carvalho, Usuário Externo**, em 24/01/2023, às 11:50, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Manuel Doblare Castellano, Usuário Externo**, em 30/01/2023, às 15:09, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Flavio Orlando Plentz Filho, Professor do Magistério Superior**, em 02/02/2023, às 14:30, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Leandro Soares de Oliveira, Professor do Magistério Superior**, em 03/02/2023, às 15:13, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Lionel Fernel Gamarra Contreras, Usuário Externo**, em 14/02/2023, às 10:31, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2026420** e o código CRC **9F13158B**.

Agradecimentos

Aos meus pais e irmãos, meu porto seguro e maiores inspirações, pelo apoio e confiança incondicionais.

À Marina, por ser a minha melhor companhia e estar sempre ao meu lado, me dando forças pra continuar nos momentos mais difíceis.

Ao meu orientador Estevam Barbosa de Las Casas e coorientador Libardo Andrés Gonzáles Torres, que me acompanham desde 2016, pelos inestimáveis conselhos e conhecimentos compartilhados. A orientação de vocês foi fundamental para a pavimentação do árduo caminho que é a vida acadêmica.

À minha coorientadora Maria Gabriela Reis Carvalho e ao pesquisador Jeronimo Conceição Ruiz, idealizadores do projeto, pelas enriquecedoras discussões e diligente supervisão. Amadurecer como doutorando foi um desafio, e eu devo também a vocês muito do que eu aprendi nesta caminhada.

Ao professor Wagner Nunes Rodrigues e ao LCPNano (Laboratório de Caracterização e Processamento de Nanomateriais da UFMG), especialmente ao pesquisador Rafael Gonçalves, pela crucial colaboração no desenvolvimento do projeto e os significativos debates científicos.

À professora Luciana de Oliveira Andrade, ao seu grupo de pesquisa, em especial à doutorando Ana Elisa, e ao professor Gregory Thomas Kitten, pelo suporte científico e na realização de alguns experimentos deste trabalho.

Aos colegas Alexandre Enes, Fernando Augusto Mathia, Thiago Matos e Paulo Henrique Ramos, que participaram ativamente no desenvolvimento dos protocolos biológicos e de engenharia implementados neste projeto de doutorado, e a Camila Carvalho, técnica da Plataforma de Microscopia e Microanálises do Instituto René Rachou, que tanto nos ajudou, e teve paciência, durante algumas dessas etapas de implementação.

Aos colegas do Grupo de Informática de Biosistemas, Bioengenharia e Genômica (Instituto René Rachou – Fiocruz Minas), do Grupo de Engenharia Biomecânica e do Departamento de Estruturas pelas conversas, ajudas e momentos de distração.

Aos professore(a)s e funcionário(a)s do Departamento de Engenharia de Estruturas e de Engenharia Mecânica.

Aos técnico(a)s e funcionário(a)s do Instituto René Rachou – Fiocruz Minas.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES), pelo apoio financeiro.

Ao Programa Inova Fiocruz pelo financiamento e à Fiocruz Minas pela infraestrutura laboratorial, plataformas tecnológicas e recursos humanos alocados.

"Do or do not. There is no try."
Y.

Resumo

Ao redor do mundo, a pesquisa e desenvolvimento de fármacos enfrenta uma conjuntura de baixa eficiência em seus projetos. A maior contribuição para isso é a utilização das plataformas padrões de cultura celular *in vitro* e os modelos animais. Nesse cenário, a tecnologia *Organ-on-a-chip*, baseada na microfluídica e na engenharia de tecidos, surge como uma plataforma promissora para a biomimetização *in vitro* de órgãos, incluindo a medula óssea. O objetivo principal dessa tese é projetar um sistema microfisiológico baseado na histologia e microarquitetura medulares com foco no estudo do comportamento das células em condições fisiológicas e patológicas, principalmente o estudo da leucemia linfóide aguda. Para esse fim, a primeira etapa do projeto foi a conceptualização da geometria do microdispositivo. A próxima etapa foi a de verificação do microdispositivo como uma plataforma capaz de fornecer condições fisiológicas e de perfusão de fluidos análogas às que as células da medula experimentam *in vivo*. O perfil de velocidade do escoamento e a distribuição de oxigênio foram calculados a partir da implementação do modelo computacional usando o programa de elementos finitos Comsol Multiphysics® v5.6, especificamente pelo sistema de equações de fenômenos de transporte e da dinâmica celular. Para a construção do modelo computacional, o parâmetro hidráulico de porosidade da matriz de hidrogel representativa foi calculado utilizando um microscópio eletrônico de varredura e o software livre ImageJ. Após a simulação, o microdispositivo foi produzido utilizando as técnicas de microfabricação baseadas na impressão 3D em resina acrílica e na moldagem por litografia suave, com o polidimetilsiloxano sendo o material base. Por esse método de microfabricação ser relativamente novo em aplicações *Organ-on-a-chip* duas etapas foram realizadas, uma para avaliar os padrões gerados, por meio de medições utilizando uma lupa eletrônica e um perfilômetro, e a possibilidade do material ser citotóxico, por meio de um ensaio que mede a atividade metabólica celular. Ao final realizou-se um estudo preliminar de cultura tridimensional estática de células na nova plataforma microfisiológica. Células Jy que emulam as células leucêmicas da leucemia linfóide aguda foram cultivadas em uma matriz padrão de colágeno tipo I, onde avaliou-se a viabilidade e a morfologia celular. Os resultados obtidos indicam que os protocolos e o modelo computacional implementados para o projeto do sistema microfisiológico geraram uma plataforma biomimética que fornece às células um microambiente mecânico, físico e bioquímica com relevância biológica, se configurando como uma primeira abordagem para a representação do que elas experimentam *in vivo* na medula óssea. Assim, a plataforma denotada por *Integrated Marrow Niches-on-a-chip* pode vir a ser uma ferramenta útil para a triagem de drogas e o estudo de novas abordagens terapêuticas.

Palavras-chave: Medula óssea. Microfluídica. Biomimetização. *Organ-on-a-chip*.

Abstract

Around the world, Drug research and development faces a situation of low efficiency in their projects. The biggest contribution to this is the utilization of standard cell culture platforms *in vitro* and animal models. In this scenario, the Organ-on-a-chip technology, based on microfluidics and tissue engineering, emerges as a promising platform for the *in vitro* biomimicking organs, including bone marrow. The main objective of this thesis is to design a microphysiological system based on marrow histology and microarchitecture with focus on the study of cell behavior under physiological and pathological conditions, mainly the study of acute lymphocytic leukemia. For this purpose, the first step of this project was the geometry microdevice conceptualization. The next step was to verify the microdevice as a platform capable providing physiological and fluid perfusion conditions analogous to what the marrow cells experience *in vivo*. The flow velocity profile and the oxygen distribution were calculated from the implementation of the computational model using the finite element software Comsol Multiphysics® v5.6, specifically through the system of equations of transport phenomena and cell dynamics. For the construction of the computational model, the hydrogel matrix representative hydraulic parameter of porosity was calculated using a scanning electron microscope and the free software ImageJ. After the simulation, the microdevice was manufactured using microfabrication techniques based on 3D printing in acrylic resin and molding by soft lithography, with polydimethylsiloxane as the base material. As this microfabrication method is relatively new in Organ-on-a-chip applications, two steps were performed, one to evaluate the generated patterns, through measurements using an electronic magnifying glass and a profilometer, and then the verification if the material is cytotoxic, using a test that measures cellular metabolic activity. At the end, a preliminary study of three-dimensional static cell culture was carried out on the new microphysiological platform. Jy cells that emulate the leukemia cells of acute lymphocytic leukemia were cultured in a standard type I collagen matrix, where cell viability and morphology were evaluated. The obtained results indicate that the protocols and the computational model implemented for the project of the microphysiological system generated a biomimetic platform that provides the cells with a mechanical, physical and biochemical microenvironment with biological relevance, configuring itself as a first approach for the representation of what they experience *in vivo* in the bone marrow. The platform denoted by Integrated Marrow Niches-on-a-chip may prove to be a useful tool for drug screening and the study of new therapeutic approaches acute acute lymphocytic leukemia.

Keywords: Bone marrow. Microfluidics. Biomimicking. Organ-on-a-chip

Lista de ilustrações

Figura 1 – Uma visão geral das etapas do processo de desenvolvimento de fármacos.	22
Figura 2 – Malha de osso trabecular e cavidades medulares: sítio tridimensional poroso, interconectado e vascularizado que regulam as funções e o crescimento celular.	29
Figura 3 – Hematopoese humana normal: processo de diferenciação das CTHs em múltiplas linhagens de células sanguíneas.	31
Figura 4 – Ilustração esquemática dos componentes dos sítios das CTHs na MO: biologia e sinais bioquímicos, físicos e mecânicos do microambiente. . .	32
Figura 5 – Nicho da células tronco hematopoiéticas (CTHs) e das células tronco leucêmicas (CTLs): distribuição de oxigênio e formação de novas regiões de hipóxia.	36
Figura 6 – Microambiente celular 2D e 3D: sinais biomecânicos e bioquímicos. . .	38
Figura 7 – Projeto genérico de um sistema microfluídico.	41
Figura 8 – Esquema de escoamento dirigido pela gravidade utilizado em microfluídica para a cultura de células em microdispositivos: representação da montagem e da característica do escoamento.	42
Figura 9 – Representação esquemática da unidade de repetição e da estrutura linear do PDMS.	45
Figura 10 – Etapas do processo de ativação de superfícies utilizando o plasma de oxigênio.	46
Figura 11 – Esquema ilustrativo do processo de microfabricação de dispositivo em PDMS. Litografia (1-3). <i>Soft-lithography</i> (4-6).	47
Figura 12 – Esquema ilustrativo para os fenômenos que podem ocorrer dependentes das geometrias do dispositivo: emparelhamento e decaimento.	48
Figura 13 – SLS vs. DLP vs. MSLA.	50
Figura 14 – Inibição da cura do PDMS em moldes 3D impressos.	51
Figura 15 – Esquema ilustrativo da biomimetização de sítios específicos de órgãos do corpo humano em dispositivos OoC: (A) <i>Lung-on-a-chip</i> . (B) <i>Gut-on-a-chip</i>	53
Figura 16 – Dispositivo <i>bone-marrow-on-a-chip</i> : representação do microambiente da medula óssea no osso humano e a sua mimetização nos respectivos canais (vista de seção do microdispositivo).	57
Figura 17 – Esquema ilustrativo do <i>multi-niche microvascularized human bone-marrow-on-a-chip</i>	58
Figura 18 – Esquema ilustrativo do <i>bone marrow-on-a-chip</i>	59
Figura 19 – Esquema ilustrativo do <i>leukemia-on-a-chip</i>	60

Figura 20 – Trajetórias de elementos fluidos em um escoamento: (a) regime laminar e (b) regime turbulento	63
Figura 21 – Preparo das amostras de PDMS para o teste MTT: (A) Molde de resina e cura do PDMS. (B) Montagem das amostras na placa de 96 poços.	72
Figura 22 – Imagem representativa do hidrogel de colágeno no MEV e das propostas de quantificação da microestrutura. (A) Anotações indicando os parâmetros de diâmetro do poro e da fibra. (B) <i>Thresholding</i> –Binarização de uma imagem gerada pelo MEV.	74
Figura 23 – Representação computacional do volume de controle e das condições de contorno no modelo simplificado.	77
Figura 24 – Esquema das etapas para a construção de um modelo conceitual baseado em um sistema biológico complexo: (A) Sistema biológico. (B) Elementos funcionais. (C) Solução de engenharia.	81
Figura 25 – Vista de seção do modelo conceitual do IMNoC.	82
Figura 26 – Esquema ilustrativo da relação entre a equação de Young-Laplace e a contenção/preenchimento por gel nas câmaras microfluídicas.	83
Figura 27 – Vista superior do projeto do microdispositivo IMNoC: 1) Entrada do canal fluídico. 2) Canal fluídico de entrada. 3) Saída do canal fluídico. 4) Canal fluídico de saída. 5) Entrada do gel e cultura celular. 6) Câmaras de cultura - 6.1. Câmara endosteal; 6.2. Câmara central; 6.3. Câmara perivascular. 7) Portas de contenção interface meio-gel. 8) Portas de contenção interface gel-gel. <i>Escala</i> : mm.	84
Figura 28 – Vista de seção do projeto do microdispositivo IMNoC. As linhas tracejadas e contínuas representam as entradas, saídas e os canais fluídicos e a câmara de cultura celular tridimensional, respectivamente. <i>Escala</i> : mm.	85
Figura 29 – Vista trimétrica do projeto do microdispositivo IMNoC.	85
Figura 30 – Molde do IMNoC baseado na manufatura aditiva por impressão 3D.	86
Figura 31 – Preparo do PDMS para <i>soft-lithography</i> : (A) Solução de elastômero e agente de cura imediatamente após a homogeneização. (B) Solução de elastômero e agente de cura imediatamente após a degaseificação.	86
Figura 32 – Cura do PDMS nos moldes de resina: (A) Inibição da cura no molde não tratado. (B) Réplica total das microestruturas no PDMS no molde tratado.	87
Figura 33 – Utensílios utilizados para a fabricação do IMNoC.	88
Figura 34 – Manufatura do IMNoC: (A) Destacamento do PDMS do molde de resina. (B) Corte e detalhamento da estrutura de PDMS. (C) Furos fabricados no IMNoC.	88

Figura 35 – Montagem prévia do sistema completo do IMNoC: (A) Estrutura de PDMS fixada naturalmente à lamínula de vidro. (B) Preenchimento independente das câmaras perivascular e endosteal. (C) Preenchimento independente de todas as câmaras de cultura.	89
Figura 36 – Montagem completa do IMNoC após vedação utilizando o plasma de oxigênio. (A) Vista superior do IMNoC. (B) Vista inferior do MINoC. . .	90
Figura 37 – Etapa teste de preenchimento do microdispositivo IMNoC com hidrogel de colágeno tipo I 4 mg/mL. (A) Imagem macro dos canais preenchidos com colágeno e com ar. (B) Imagem do compartimento de cultura com colágeno e dos canais fluídicos. (C) Imagens indicando as regiões de interface colágeno-ar.	92
Figura 38 – Mapa tridimensional do perfil das estruturas do IMNoC. (A) Espessura dos microcanais. (B) Depressão das portas para avaliar a espessura. . .	94
Figura 39 – Gráficos de barras para as espessuras dos dispositivos. (A) Microcanais fluídicos. (B) Portas de contenção. (C) Microcanais fluídicos - grupo 1. (D) Portas de contenção - grupo 1.	95
Figura 40 – Nova geometria para as portas de contenção e novas dimensões para as espessuras.	98
Figura 41 – Rugosidade da superfície do molde mestre 3D impressora em resina acrílica.	98
Figura 42 – Absorbância no MTT e imagens representativas para a cultura das H9c2. (A) Controle para 24 horas. (B) PDMS para 24 horas. (C) Controle para 72 horas. (D) PDMS para 72 horas.	99
Figura 43 – Absorbância no MTT e imagens representativas para a cultura das H9c2 no grupo teste. (A) PDMS para 24 horas. (B) PDMS para 72 horas. (C) PDMS para 168 horas.	100
Figura 44 – Imagens representativas da viabilidade das células Jy nas câmaras de cultura no microdispositivo IMNoC. (A) Perivascular-central. (B) Central-endosteal. <i>Aumento: 10X</i>	101
Figura 45 – Imagens representativas da viabilidade e morfologia das células Jy em cada nicho da medula óssea. (A) Perivascular. (B) Central. (C) Endosteal. <i>Aumento: 40X</i>	102
Figura 46 – Imagem representativas da distribuição das células Jy nas câmaras de cultura no microem cada nicho da medula óssea. (A) Perivascular-central. (B) Central-endosteal. <i>Aumento: 10X</i>	103
Figura 47 – Imagem representativa da integração física e biológica entre todos os nichos <i>in vitro</i> do IMNoC. (A) Nichos perivascular-central. (B) Nichos central-endosteal. (C) e (D) Influência da porta de contenção na formação da integração entre os nichos.	104

Figura 48 – Ajuste do pH da solução de colágeno. (A) Análise quantitativa do pH utilizando uma fita de pH. (B) Análise qualitativa do pH pela coloração da solução de colágeno.	105
Figura 49 – Imagens do MEV da microestrutura tridimensional do hidrogel e das fibras de colágeno. (A) Amplificação de 700 X. (B) 2 kX. (C) 8 kX. (D) 15 kX. (E) 30 kX. (F) 60 kX.	106
Figura 50 – Histograma e gráfico de barras para quantificar a geometria dos poros na matriz de colágeno. (A) Diâmetro do poro. (B) Área do poro.	107
Figura 51 – Distribuição da concentração de oxigênio nos nichos do IMNoC para os primeiros parâmetros de concentração celular e velocidade de escoamento intersticial. Dados para uma linha média em 93,5 μm de altura.	110
Figura 52 – Análise fluidodinâmica no microdispositivo IMNoC. (A) Gradiente de pressão linear através da matriz de colágeno. (B) Campo de velocidades: distribuição das velocidades no plano x - y , z - x e linhas de corrente.	111
Figura 53 – Velocidade intersticial do escoamento nos compartimento de cultura ao longo do eixo x em três regiões distintas. Linha 1, centralizado no modelo. Linha 2, deslocada para a direita. Linha 3, deslocada para a esquerda.	112
Figura 54 – Velocidade intersticial do escoamento nos compartimento de cultura ao longo do eixo z . Linhas transversais centradas no meio de cada nicho representativo.	113
Figura 55 – Distribuição da concentração de oxigênio nos nichos do IMNoC para os parâmetros ajustados de concentração celular e velocidade de escoamento intersticial. Dados para uma linha média em 93,5 μm de altura.	114
Figura 56 – Análise de transporte de massa e da dinâmica celular no microdispositivo IMNoC. (A) Distribuição da concentração de oxigênio ao longo dos microcanais: planos x - y e x - z . (B) Distribuição normalizada da concentração celular nos compartimento de cultura. (C) Distribuição do consumo de oxigênio como função das células nos compartimento de cultura.	115
Figura 57 – Consumo de oxigênio pela concentração celular no microdispositivo IMNoC.	117

Lista de tabelas

Tabela 1 – Panorama das propriedades dos principais termoplásticos utilizados na microfabricação de dispositivos microfluídicos.	44
Tabela 2 – Materiais utilizados para a mimetização da medula óssea.	55
Tabela 3 – Parâmetros para a impressão 3D em resina acrílica.	69
Tabela 4 – Comparativo entre as principais dimensões do modelo físico e do projeto. Todos os valores estão apresentados em μm	93
Tabela 5 – Características microestruturais do hidrogel de colágeno tipo I 4 mg/mL.	107

Lista de abreviaturas e siglas

ADME	Absorção, distribuição, metabolismo e excreção
Ang-1	do inglês, <i>Angiopoietin-1</i>
AND	Aplicação da nova droga
BMOaC	do inglês, <i>Bone marrow-on-a-chip</i>
CAD	do inglês, <i>Computer aided design</i>
CE	Células endoteliais
CTH	Células tronco hematopoiéticas
CTL	Células tronco leucêmicas
CTM	Células tronco mesenquimais
CXCL12	do inglês, <i>C-X-C motif chemokine 12</i>
DLP	do inglês, <i>Digital light projection screen</i>
DMD	do inglês, <i>Digital micromirror device</i>
DP	Desvio padrão
FDA	do inglês, <i>Food and Drug Administration</i>
FDM	do inglês, <i>Fused deposition modeling</i>
FRAP	do inglês, <i>Fluorescence Recovery After Photobleaching</i>
HIF-1 α	do inglês, <i>Hypoxia inducible factor</i>
IMNoC	do inglês, <i>Integrated Marrow Niches-on-a-chip</i>
IND	Investigação da nova droga
LLA	Leucemia linfoide aguda
LMA	Leucemia mieloide aguda
MEC	Matriz extracelular
MEV	Microscópio eletrônico de varredura

MSLA	do inglês, <i>Masked stereolithography</i>
MO	Medula óssea
OB	Osteoblastos
OC	Osteoclastos
OoC	do inglês, <i>Organ-on-a-chip</i>
Pe	Número de Peclet
P&D	Pesquisa e desenvolvimento
PDMS	do inglês, <i>Poly(dimethylsiloxane)</i>
PC	Policarbonato
PMMA	Poli(metil metacrilato)
PS	Poliestireno
Re	Número de Reynolds
SFB	Soro fetal bovino
SDF-1	do inglês, <i>Stromal cell-derived factor 1</i>
SMF	Sistema microfisiológico
SLA	do inglês, <i>Stereolithography</i>

Lista de símbolos

d	Largura do canal microfluídico
h	Altura do canal microfluídico
l	Largura das estruturas internas do canal microfluídico
l_0	Largura inicial das estruturas internas do canal microfluídico
ρ	Escalar de densidade do fluido
\mathbf{v}	Vetor de velocidades do fluido
$\boldsymbol{\sigma}$	Tensor de tensões de segunda ordem
\mathbf{g}	Vetor do campo de gravidade
P	Escalar de pressão do fluido
μ	Viscosidade dinâmica do fluido
v	Velocidade característica
L	Comprimento característico
ν	Viscosidade cinemática do fluido
κ	Permeabilidade do meio poroso
c_α	Escalar de concentração de soluto
D_α	Coefficiente de difusão de uma espécie genérica
R_{c_α}	Escalar de fonte/sumidouro da concentração de uma espécie genérica α
ϕ	Porosidade do meio poroso
D_α^{ef}	Coefficiente de difusão efetiva de uma espécie genérica em um meio poroso
n	Escalar de concentração celular
D_n	Coefficiente de difusão celular isotrópica
$R_{f,n}$	Taxa de crescimento celular
$R_{d,n}$	Taxa de morte celular

R_{max}	Taxa máxima de crescimento celular
K_c	Parâmetro de Contois
V_n	Volume de um única célula
ρ_n	Densidade de uma única célula
$R_{max,\alpha}$	Taxa máxima de consumo de um soluto α genérico
$C_{MM,\alpha}$	Constante de Michaelis-Mentem
$C_{cr,\alpha}$	Concentração crítica de um soluto α genérico
δ	Função suave de Heaviside
ρ_{PDMS}	Densidade do PDMS
N	Máxima concentração celular em um domínio específico
V_{MP}	Volume projetado da câmara
V_{MP}	Volume relativo a média dos valores calculados
ε	Erro relativo à dimensão projetada
\mathbf{q}	Vazão volumétrica
v_{MP}	Velocidade de projeto na câmara
v_{MF}	Velocidade relativa ao erro dos valores calculados
A_{MP}	Área de projeto na câmara
A_{MF}	Área relativa ao erro dos valores calculados

Sumário

1	Introdução	21
1.1	Motivação	21
1.2	Justificativa	26
1.3	Hipóteses	26
1.4	Objetivos	26
1.5	Descrição do trabalho	27
2	Revisão da Literatura	28
2.1	Medula Óssea: Estrutura, Composição e Função	28
2.1.1	Estrutura e função da medula óssea normal	28
2.1.2	Sítios hematopoéticos: nichos da medula óssea	31
2.1.2.1	Características geométricas e biomecânicas	33
2.1.2.2	Células específicas e elementos bioquímicos	34
2.1.2.3	Distribuição de oxigênio nos nichos	35
2.1.3	Microambiente leucêmico da medula óssea	35
2.2	<i>Organ-on-a-Chip</i> : da Cultura Celular 2D à Biomimetização de Órgãos em Dispositivos Microfisiológicos	37
2.2.1	Plataformas de cultura celular: modelos 2D e 3D	37
2.2.2	Introdução aos sistemas microfluídicos	40
2.2.2.1	Microfabricação em microfluídica: materiais, tratamentos superficiais e métodos	43
2.2.3	Tecnologia <i>Organ-on-a-Chip</i>	51
2.2.3.1	Biomimetização da medula óssea	53
2.3	Modelagem Computacional em <i>Organ-on-a-Chip</i> : Fenômenos de Transporte e do Comportamento das Células	61
2.3.1	Fluidodinâmica	61
2.3.1.1	Equações de Navier-Stokes	61
2.3.1.2	Equação de Brinkman	63
2.3.2	Transporte de massa: equação de advecção-difusão	64
2.3.3	Dinâmica celular	66
2.3.3.1	Equação de Contois	66
2.3.3.2	Modelo cinético de Michaelis-Mentem	66
3	Materiais e Metodologia	68
3.1	Propósito, projeto e fabricação do IMNoC	68
3.1.1	Cálculo da pressão de extravasamento	70
3.1.2	Avaliação da geometria do IMNoC	70
3.1.3	Ensaio de citotoxicidade do PDMS moldado	71

3.2	Caracterização da matriz de colágeno	72
3.2.1	Preparação do gel de colágeno	72
3.2.2	Microscópio eletrônico de varredura	73
3.2.3	Análise microestrutural	74
3.3	Primeiro modelo celular no IMNoC: estudos preliminares	75
3.3.1	Cultura celular	75
3.3.2	Preparação da matriz tridimensional	75
3.3.3	Cultura das células e injeção de colágeno	76
3.3.4	Análise qualitativa da cultura celular	76
3.4	Modelo computacional	76
4	Resultados e Discussões	81
4.1	Dispositivo IMNoC do tipo OoC para a mimetização da MO	81
4.2	Manufatura, montagem e investigação do IMNoC	86
4.2.1	Análise das dimensões do IMNoC	93
4.3	Ensaio MTT	99
4.4	Cultura celular no IMNoC	101
4.5	Estudo microestrutural	105
4.6	Simulação computacional do IMNoC	109
4.6.1	Limitações do modelo	118
5	Conclusões e Perspectivas Futuras	120
5.1	Conclusões	120
5.2	Perspectivas Futuras	123
	Referências	125
	Anexos	146
	ANEXO A Documento da Fiocruz de recomendação de depósito prioritário	
	da patente	147

1 Introdução

Neste capítulo é apresentada uma introdução sobre o processo de desenvolvimento de novas drogas e abordagens terapêuticas, os desafios envolvidos, e como a evolução nos métodos de representação do microambiente celular *in vivo* tem sido fundamental nesse enfrentamento. Como assunto principal da tese, são apresentados aspectos fundamentais da medula óssea humana e o que motivou a busca por uma melhor compreensão do seu funcionamento em condições fisiológicas e patológicas.

1.1 Motivação

Ao longo dos últimos anos, o desenvolvimento de novas tecnologias aplicadas à química medicinal modificou substancialmente o processo de descoberta de compostos com relevância bioquímica ou farmacológica. A otimização da triagem *in vitro*, o aumento do número de dados e o projeto de drogas para alvos com estruturas específicas foram alguns dos avanços responsáveis por estabelecer essa nova era no processo de pesquisa e desenvolvimento (P&D) de fármacos (Lombardino and Lowe, 2004). Seguindo a definição da agência federal americana *Food and Drug Administration* (FDA)¹, o P&D aplicado à farmacologia pode ser dividido em cinco etapas principais: (1) descoberta e desenvolvimento; (2) pesquisa pré-clínica; (3) pesquisa clínica; (4) revisão da droga; e (5) monitoramento de segurança das drogas pós-comercialização (Figura 1). As etapas 1, 2 e 3 são cruciais no processo de P&D. A primeira se inicia com a pesquisa básica gerando novas ideias sobre a evolução das doenças no corpo humano e quais os meios para reverter ou eliminar os seus efeitos. Nessa pesquisa é identificado e caracterizado o alvo farmacológico que, por sua vez, permite a seleção de uma miríade de substâncias químicas como potenciais compostos¹. Entretanto, devido aos conhecimentos prévios sobre eficácia, toxicidade ou dificuldades na manufatura dessas substâncias, uma grande quantidade é rejeitada, restando assim as que apresentam maior afinidade e especificidade com o alvo. Essas substâncias selecionadas são chamadas de drogas líderes, e entram na etapa pré-clínica do P&D, na qual são aplicados métodos de triagem de alto rendimento (Christoffersson, 2018).

A etapa pré-clínica é definida como a prévia antes da utilização de humanos para o teste das drogas. Métodos de cultura *in vitro* e *in vivo* são utilizados para a avaliação de potencial toxicidade da substância e dos perfis farmacocinético e farmacodinâmico, além de fornecer informações detalhadas sobre os níveis de dosagem e seus efeitos¹. Essa avaliação seleciona um número reduzido de drogas, que passarão por um processo de

¹ U.S Food and Drug Administration. (2018, Abril 01). *The Drug Development Process*. <https://www.fda.gov/patients/learn-about-drug-and-device-approvals/drug-development-process>

Figura 1 – Uma visão geral das etapas do processo de desenvolvimento de fármacos.

Descoberta e Desenvolvimento	Pesquisa Pré-clínica	Pesquisa Clínica			Revisão e Monitoramento
<ul style="list-style-type: none"> · Pesquisa básica · Conhecimento da doença · Identificação do alvo · Caracterização do alvo · Triagem dos compostos 	<ul style="list-style-type: none"> · Cultura celular <i>in vitro</i> · Experimentos animais <i>in vivo</i> · ADME · Ensaios de toxicidade · Ensaios de dosagem · Identificação dos candidatos · Aplicação dos ensaios clínicos 	Fase I <ul style="list-style-type: none"> · Dosagem · Segurança 	Fase II <ul style="list-style-type: none"> · Eficácia · Efeitos colaterais 	Fase III <ul style="list-style-type: none"> · Eficácia · Efeitos adversos · IND · Revisão 	<ul style="list-style-type: none"> · AND · Revisão pelas autoridades · Aprovação pelas autoridades · Registro da droga · Inspeções de manufatura · Relatórios de problemas · Vigilância ativa
5000 – 10000 compostos	250 compostos	20 - 100 pacientes saudáveis	Vários pacientes patológicos	300 - 3000 pacientes patológicos	1 nova droga
		5 compostos	3 – 4 compostos	1 – 2 compostos	
		6 – 12 meses	6 meses – 2 anos	1 – 4 anos	
3 – 5 anos	1 – 2 anos	6 – 7 anos			1 – 2 anos
					Custos

Fonte: Adaptado de Matthews et al. (2016) e Christoffersson (2018).

triagem na terceira etapa (pesquisa clínica). Dividida em três fases, essa etapa tem como desígnio avaliar a ação e interação das drogas em humanos, por meio da validação de absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME) e toxicidade, além da sua eficácia para as doenças alvos (Paul et al., 2010). O propósito da Fase I é o desenvolvimento do protocolo de aplicação das drogas (*e. g.* concentração ideal que minimiza ou elimina os efeitos colaterais) em pacientes saudáveis. Estima-se que 70% das drogas testadas avançam para a próxima fase. Na Fase II ocorrem os ensaios em uma pequena amostra de pacientes acometidos pela doença, em que o objetivo principal é avaliar o protocolo em situação patológica. Em média, 33% das novas drogas são selecionadas para a fase final. A fase final (Fase III), é realizada para um espaço amostral maior de pacientes, com a combinação de populações e regiões distintas e dosagens variadas, avaliando a viabilidade da droga nessas condições. Após essa fase, 25-30% das drogas que entraram no desenvolvimento de fármacos e foram testadas passam pelos processos de revisão para posterior aprovação¹. Por fim, nas etapas 4 (Revisão) e 5 (Monitoramento), a droga selecionada passa por outro processo de revisão e estudo detalhado pelas agências reguladoras¹⁰⁹ e, ao ser distribuída no mercado, fica sobre constante monitoramento, seja dos processos envolvidos na manufatura ou da segurança, dosagem e possíveis efeitos colaterais que possam acontecer. Contudo, apesar das diretrizes aplicadas no P&D, a taxa de sucesso no desenvolvimento de novas drogas é de apenas 10% (Hay et al., 2014). Essa baixa eficiência configura um problema real e crítico para as indústrias farmacêuticas, sendo considerada um dos maiores desafios enfrentados atualmente.

O cenário que se apresenta para o desenvolvimento de novos compostos farmacológicos ao redor do mundo é claro: a cada ano é investido mais capital em projetos que

frequentemente falham nos últimos estágios, especialmente na fases II e III da pesquisa clínica (Hay et al., 2014). Em média, calcula-se que é investido algo em torno de 2 bilhões de dólares em projetos que podem levar de 10 a 15 anos desde a concepção até a conclusão (DiMasi et al., 2016). A combinação de um alto investimento de capital e tempo, com uma taxa de sucesso baixíssima, estimulou a comunidade científica a estudar quais parâmetros contribuem significativamente para esse padrão no P&D. Dentre todos os motivos relevantes e associados às ocorrências dessas falhas, um dos principais é a utilização de métodos tradicionais simplificados de cultura celular *in vitro* ou *in vivo*.

A construção de novas bases científicas no estudo da biologia do corpo humano, e, conseqüentemente, o desenvolvimento de novos protocolos clínicos, foram positivamente impactados pelo avanço na utilização da cultura celular *in vitro*, que se deu a partir do século XX (Harrison et al., 1907), e dos modelos animais, sendo estes reportados desde os gregos antigos (Ericsson et al., 2013), como ferramentas para o estudo do comportamento celular em processos fisiológicos e patológicos do corpo humano. Contudo, eles apresentam algumas limitações na representação do microambiente que as células humanas experimentam *in vivo*, resultando no grande número de fármacos que não avançam nos testes realizados na etapa de pesquisa clínicas. Os modelos tradicionais de cultura celular *in vitro*, divididos entre plataformas 2D e 3D, não representam adequadamente a arquitetura da maioria dos microambiente celulares (plataformas 2D) e também não permitem que sejam gerados gradientes físico-químicos com evolução espaço-temporal estimulados por um escoamento fisiológico (plataformas 2D e 3D) (Duval et al., 2017). Por outro lado, nos modelos animais, devido aos aspectos biológicos de divergência genética com humanos, a extrapolação experimental e predições em alguns processos patofisiológicos específicos não é possível (Shanks et al., 2009). Além dos aspectos biológicos, a partir de uma perspectiva ética, diversas instituições e grupos de pesquisas (Buzek and Ask, 2009) e agências reguladoras (European Commission, 2010) estão desenvolvendo métodos alternativos para a redução de testes em animais, projetando uma completa substituição em um futuro próximo.

As bases desses métodos alternativos podem ser divididas em três fundamentos principais: Substituição – métodos que evitam ou substituem o uso de animais; Redução – métodos que minimizem o número de animais utilizados em experimentos; e Refinamento – métodos que minimizem o sofrimento de animais e melhorem o bem-estar² (Tannenbaum and Bennett, 2015). Esses fundamentos compõem o princípio dos 3Rs (*Replacement, Reduction and Refinement*), desenvolvido por Russel e Burch (1959) e que norteia a utilização de métodos alternativos para estudos em animais. Esse novo ponto de vista ético quanto à adequação dos protocolos experimentais *in vivo* estimularam diversos países a adotarem esses métodos. Por exemplo, no Brasil, em julho de 2012, o Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTI) criou a Rede Nacional de Métodos Alternativos

² National Centre For Replacement Refinement & Reduction of Animals in Research. (n.d.). *The 3Rs*. <https://www.nc3rs.org.uk/the-3rs#replacement>

(RENAME). Já em setembro do mesmo ano, em uma parceria entre a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) e o Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz (INCQS/Fiocruz), foi fundado o Centro Brasileiro de Validação de Métodos Alternativos (BraCVAM) (Marin and Pagani, 2018). Essas ações tornaram o Brasil o primeiro país da América Latina a adotar as diretrizes dos 3Rs na experimentação animal (Laquieze et al., 2015). Contudo, para além dos 3Rs, novas diretrizes vem sendo propostas, criando-se assim novos princípios, como por exemplo o 4Rs (*Replacement, Reduction, Refinement, and Refusal*), em que o novo princípio implica que o uso de animais apenas com a possibilidade de se gerar benefícios razoáveis (Lee et al., 2020). Considerando todo o contexto apresentado sobre essas novas ações em experimentos *in vivo*, além da falibilidade do desenvolvimento de novas drogas pela adoção das abordagens tradicionais de cultura, os métodos alternativos vêm ganhando destaque na mimetização do comportamento de células, tecidos e órgãos. Um expoente desses novos métodos são os sistemas microfisiológicos (SMF) (Peterson et al., 2020), baseados na integração da cultura celular com a tecnologia de microfluídica.

Sistemas microfisiológicos são definidos como “plataformas microfabricadas, integrativas, projetadas para recapitular *in vitro* as unidades funcionais de órgãos humanos” (Bai and Wang, 2020). No âmbito da biomimetização dos sítios do corpo humano, os SMF, também conhecidos como uma tecnologia *Organ-on-a-Chip* (OoC), se tornaram uma ferramenta expoente para o estudo da biologia do corpo humano e para a triagem de fármacos (Chan et al., 2011; Polini et al., 2014; Chi et al., 2016; Jodat et al., 2018) por serem capazes de representar aspectos-chaves do funcionamento de órgãos e tecidos. A importância da utilização dos OoCs para a implementação de modelos biológicos *in vitro* foi consolidada quando o Fórum Econômico Mundial, em 2016, definiu essa tecnologia como uma das mais emergentes do mundo³. Em umas das aplicações fundamentais da tecnologia OoC, a mimetização de unidades funcionais de um dos órgãos mais importantes do corpo humano, a medula óssea (MO), nos últimos anos, tem se tornado foco de estudos por diversos grupos de pesquisa transdisciplinares.

A medula é um órgão fundamental do corpo humano, responsável pela produção dos glóbulos vermelhos, brancos e plaquetas, células-chaves para a manutenção da homeostase fisiológica de um sistema vivo saudável (Gulati et al., 1988), um processo conhecido como hematopoese. A medula é composta por três regiões principais, chamadas de nichos, que são diferenciadas por suas propriedades estruturais, composição e secreções celulares que regulam todos os processos dinâmicos envolvidos na MO (Belyavsky, 2019).

A MO é responsável por regular vários processos celulares, incluindo diferenciação e proliferação. Devido ao comportamento biologicamente dinâmico das células, existem

³ Al-Rodhan, N. (2016, Junho 03). Scientific American. *Organs-on-Chips Allow New Views of Human Biology*. <https://www.scientificamerican.com/article/organs-on-chips-allow-new-views-of-human-biology>

patologias associadas à medula que podem ser prejudiciais ou fatais para os seres humanos. Algumas das patologias mais comuns são as variantes de leucemia linfóide aguda (LLA) e mieloide aguda, linfóide crônica e mieloide crônica (Penchansky, 2003). A LLA é a leucemia infantil mais recorrente, acometendo crianças entre 2 e 9 anos (Penchansky, 2003). A LLA também pode ser diagnosticada em adultos, porém em uma forma mais severa (Terwilliger and Abdul-Hay, 2017). Atualmente existem cinco tratamentos padrão que são utilizados para enfrentar a LLA: (1) Radioterapia – tratamento que utiliza radiação para matar as células cancerígenas ou impedi-las de crescer; (2) Quimioterapia – tratamento que utiliza drogas para inibir o crescimento das células cancerígenas, as matando ou impedindo a sua divisão; (3) Quimioterapia com transplante de células tronco – tratamento análogo ao realizado na quimioterapia, mas com transplante de células tronco como tratamento para a reposição das células formadoras do sangue mortas durante o processo; (4) Terapia direcionada – tratamento que utiliza drogas capazes de identificar e enfrentar, precisamente, tipos específicos de células cancerígenas; (5) Imunoterapia – tratamento que utiliza as células do sistema imune do paciente para combater o câncer⁴. Todos os cinco tratamentos são agressivos para as células saudáveis do corpo humano, com uma ressalva para a terapia direcionada, que geralmente causa menos danos ao corpo humano (Papadantonakis and Advani, 2016).

Nesse cenário, o desenvolvimento de abordagens que dependam da genética de cada paciente e/ou de drogas que interagem com alvos mais específicos e causem menos efeitos colaterais é um dos objetivos principais da implementação dos OoC. Entretanto, no contexto da tecnologia OoC, devido à sua complexidade fisiológica, a mimetização da medula em um sistema que integre os seus principais componentes é um desafio na pesquisa transversal. Algumas das principais lacunas que existem nos trabalhos desenvolvidos até o presente momento para a representação da medula em um microdispositivo são: cocultura das principais células; estímulos causados pelo escoamento intersticial; gradientes bioquímicos ao longo dos nichos; e propriedades mecânicas diversas para cada nicho (Rosalem et al., 2020). O desenvolvimento de um novo SMF baseado na tecnologia OoC pode representar um avanço nessa direção.

O projeto de um novo dispositivo de microfluídica para a mimetização de um órgão utilizando a tecnologia OoC apresenta etapas bem estabelecidas: modelo do funcionamento de órgão ou tecido; a proposta das unidades biológicas funcionais fundamentais; o estudo da hidrodinâmica do fluido intersticial e distribuição de substâncias; a escolha da técnica de manufatura do dispositivo; e o projeto e forma de uso do dispositivo e seus periféricos (Convery and Gadegaard, 2019).

Este trabalho apresenta um novo modelo para a implementação de um SMF

⁴ National Institutes of Health. (n. d.). National Cancer Institute. *Leukemia-Patiente Version*. <https://www.cancer.gov/types/leukemia>

OoC, representando a MO, baseado nos respectivos aspectos estruturais e fisiológicos. Essa plataforma propõe o aprimoramento da biomimetização do seu microambiente, por meio da construção de uma metodologia computacional, de prototipagem e teste para o desenvolvimento de novos SMF com potencial aplicação nas mais diversas áreas da ciência médica, incluindo a triagem de novos fármacos e o desenvolvimento de tratamentos mais eficientes para pacientes com patologias. Denotada *Integrated Marrow Niches-on-a-chip* (IMNoC), essa tecnologia pode apresentar novas soluções para os métodos alternativos utilizados no processo de P&D das indústrias farmacêuticas, sendo aplicada nas etapas que requerem a predição da resposta sistêmica do corpo humano às drogas em ensaios *in vitro*. Esse trabalho integra o Projeto "Desenvolvimento de novo modelo de Dispositivo Microfluídico para Mimetização do Microambiente Tumoral da Leucemia Linfóide Aguda", financiada pelo Programa Inova Fiocruz: Ideias Inovadoras (2018).

1.2 Justificativa

Considerando o atual cenário na P&D de fármacos, incluindo os para patologias da medula óssea, e a carência de uma representação mais fiel do microambiente da medula óssea *in vitro*, o desenvolvimento de novas plataformas microfisiológicas experimentais e computacionais que avancem nessa direção é fundamental para um melhor entendimento desse órgão e de potenciais tratamentos terapêuticos.

1.3 Hipóteses

H.1: A plataforma OoC projetada e fabricada é capaz de reproduzir *in vitro* um microambiente fisiológico/patológico representativo da MO integrando os três nichos que compõem.

H.2: O modelo computacional implementado é capaz de reproduzir *in silico* a natureza dos fenômenos de transporte em um microambiente representativo da MO.

1.4 Objetivos

O presente trabalho propõe o desenvolvimento de um protótipo preliminar de sistema biomimético OoC para o estudo do comportamento das células da MO em modelos *in vitro*. O objetivo principal é o projeto e testes iniciais de um sistema microfisiológico, experimental e computacional, baseado na histologia e microarquitetura medulares, chamado de IMNoC, utilizando ferramentas da biologia celular, engenharia de tecidos e a microfluídica. Os objetivos parciais estão descritos a seguir:

1. Desenvolver um projeto preliminar de um dispositivo IMNoC inspirado nas principais características estruturais e fisiológicas da MO.
2. Gerar, a partir de técnicas de microfabricação, modelos físicos dos dispositivos projetados.
3. Avaliar o IMNoC quanto a sua geometria e citotoxicidade.
4. Analisar, experimentalmente, o dispositivo quanto à viabilidade, morfologia e distribuição tridimensional para células representativas da LLA.
5. Caracterizar a microestrutura e as propriedades hidrodinâmicas da matriz extracelular de hidrogel representativa da MO para o modelo matemático.
6. Implementar um modelo computacional para estudar o campo de velocidades e a distribuição do oxigênio ao longo da cultura celular no IMNoC

1.5 Descrição do trabalho

O presente trabalho está dividido em 5 capítulos. O **Capítulo 1** contém a introdução da tese. Nele é contextualizada a motivação do trabalho e apresentado um breve resumo sobre os aspectos científicos envolvidos na construção do conhecimento. O **Capítulo 2** apresenta a revisão de literatura sobre a MO, abordando aspectos histológicos e fisiológicos, assim como fenômenos patológicos e o comportamento das células desse ambiente. Também é abordado o tema da microfluídica, analisando a evolução desde os modelos 2D de cultura de células até os chamados OoC. Por fim são apresentados os modelos computacionais e matemáticos que integram a implementação de uma plataforma física para a biomimetização da MO. No **Capítulo 3** são apresentados os materiais e metodologia para o desenvolvimento e construção dos modelos físico, dos protocolos experimentais utilizados no estudo do novo sistema microfisiológico OoC, além da implementação do modelo computacional. O **Capítulo 4** apresenta os resultados e discussões do trabalho. Por fim, no **Capítulo 5**, é apresentada a conclusão da presente tese com todos os pontos mais relevantes levantados ao longo desse trabalho e perspectivas futuras.

2 Revisão da Literatura

Neste capítulo é apresentada a biologia tecidual e fisiológica da medula óssea, aspectos chaves na caracterização desse órgão, com foco nas regiões fundamentais que a formam. Essa revisão da literatura é expandida para a medula óssea em condições patológicas. Na continuação, são apresentados os métodos de cultura de células desde os modelos animais e 2D, até os 3D, discutindo as vantagens e desvantagens. A revisão avança até a abordagem da cultura em microdispositivos, apresentando métodos e materiais de fabricação, e em uma nova tecnologia para a mimetização de microambientes, chamada de *Organ-on-a-Chip*, e a evolução e aplicação nos estudos de órgãos do corpo humano, com foco na medula óssea. Por fim, são apresentadas as equações matemáticas que modelam o escoamento de fluido e o transporte de substâncias dentro do medula óssea em um chip, além dos modelos que predizem o comportamento das células no microambiente *in vitro* desse órgão.

2.1 Medula Óssea: Estrutura, Composição e Função

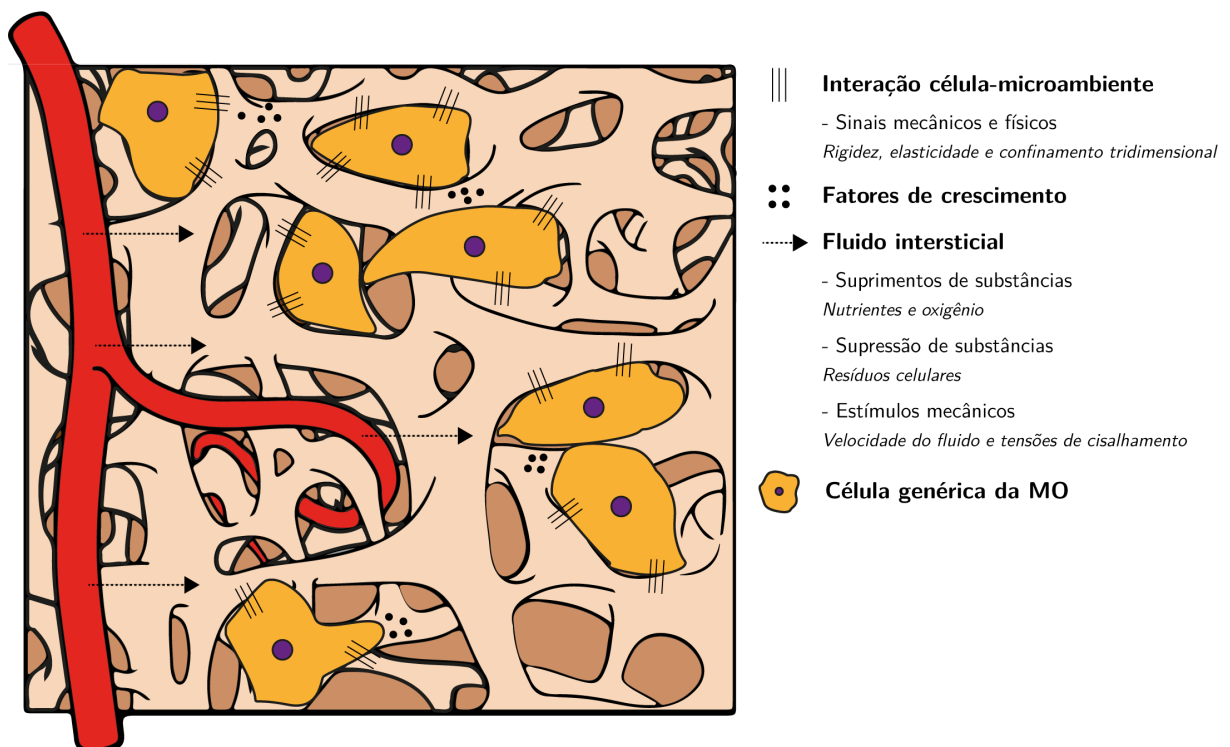
2.1.1 Estrutura e função da medula óssea normal

O compartimento trabecular é o local de um dos maiores, mais importantes e organizados órgãos do corpo humano, a medula óssea (MO). Localizada na cavidade medular, o ambiente da MO é formado, fundamentalmente, por (1) uma malha de osso trabecular, (2) vasos sanguíneos (sinusoides), (3) matriz e células estromais e (4) células hematopoiéticas (Bartl et al., 1982; Weiss and Sakai, 1984; Gulati et al., 1988; Travlos, 2006; Ott, 2018; Ingavle et al., 2019).

A *malha de osso trabecular* denota uma estrutura óssea de suporte capaz de fornecer sinais físicos e mecânicos por meio de interações célula-microambiente, além de permitir a migração celular e interações célula-célula, que regulam os processos celulares na MO (Ingavle et al., 2019). Biologicamente, o osso trabecular tem a superfície externa coberta por uma fina camada de células ósseas, especificamente os osteoblastos (OB) e osteoclastos (OC), suportadas por uma membrana vascular de tecido conectivo. Essa região é chamada de endóstio (Travlos, 2006). Estruturalmente, a malha é formada por poros de 300–600 μm em diâmetro, que constroem uma rede porosa interconectada, com porosidade de 75–85% (Lee et al., 2012), por onde ocorrem as trocas de suprimentos e resíduos celulares (Figura 2). Nos ossos chatos, por exemplo a crista ilíaca, essas trocas ocorrem devido à presença de canais vasculares chamados de vasos arteriais e sinusoides.

Os *sinusoides* são capilares terminais formados pelas ramificações dos vasos sanguíneos do corpo humano. Também conhecidos como capilares descontínuos, são um tipo denominado “capilar de poro aberto”, com diâmetro de poro variando entre 30–40 μm , e que formam duas intrincadas redes: (1) que recebe das arteríolas sangue contendo suprimentos vindo das artérias; (2) e que leva para as vênulas e veias o fluido extracelular (Travlos, 2006). O fluido extracelular, formado basicamente pelo fluido intersticial, é o responsável por irrigar todo o microambiente da MO. Pela definição do *National Cancer Institute*, o fluido intersticial está presente na matriz extracelular (MEC), oriundo de substâncias que escoam pelos capilares, e governa a entrega de oxigênio e nutrientes às células, e a remoção de resíduos gerados por elas, além de intermediar a comunicação celular e as estimular mecanicamente por meio das tensões geradas pelo respectivo escoamento (Figura 2). Como apresentado por Hillsley and Frangos (1994), o fluido intersticial que escoam pelos ossos apresenta velocidades entre 0,1–4 $\mu\text{m/s}$, especificamente na ordem de 10^{-1} $\mu\text{m/s}$ para a MO (Dafni et al., 2002), e desempenha um papel fundamental na regulação das funções celulares e nas propriedades da MEC que compõe o estroma do microambiente medular.

Figura 2 – Malha de osso trabecular e cavidades medulares: sítio tridimensional poroso, interconectado e vascularizado que regulam as funções e o crescimento celular.



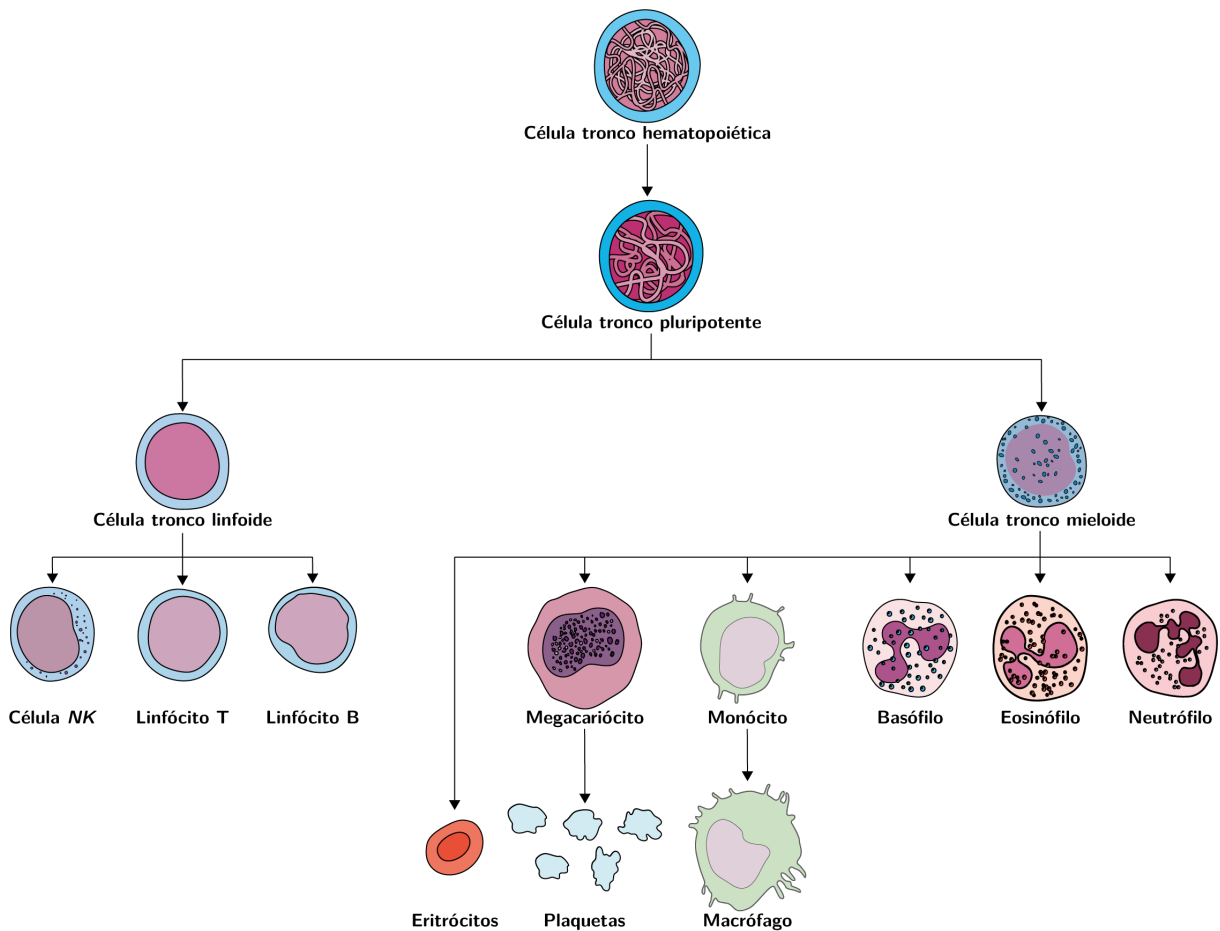
Fonte: Adaptado de Ingavle et al. (2019) e Chramiec and Vunjak-Novakovic (2019). As peças de artes utilizadas nessa figura foram fornecidas pela *Servier Medical Art* (<http://smart.servier.com>). *Servier Medical Art* pela *Servier* é licenciada sob uma licença *Creative Commons Attribution 3.0 Unported*.

A *matriz e células estromais* compõem o microambiente de suporte, também chamado de ‘microambiente indutivo hematopoiético’, para o desenvolvimento das células

sanguíneas da MO (Bartl et al., 1982). O estroma é formado por células reticulares (*e.g.*, fibroblastos), células endoteliais, macrófagos, adipócitos (células de gordura – principais componentes da chamada medula amarela, que está relacionada com a parte inativa do órgão), células ósseas (*e.g.*, OB e OC), células tronco mesenquimais (CTM) e elementos que compõem a MEC (*e.g.*, colágeno e fibronectina) (Weiss and Sakai, 1984). Especialmente em relação às CTMs, elas são responsáveis por darem origem aos outros tipos celulares do estroma, além de também o compor. Isso ocorre porque as CTMs são células multipotentes, com a característica de se diferenciar em múltiplas linhagens, o que a torna vital para a manutenção, regeneração e remodelamento do microambiente estromal (Gurkan and Akkus, 2008). Desempenhando papel chave no funcionamento da MO (as funções detalhadas dos principais componentes serão abordadas na próxima seção), o microambiente indutivo hematopoiético fornece, por meio das interações celulares e das suas propriedades físico-químicas e mecânicas, estímulos fisiológicos que regulam os processos de proliferação, diferenciação e maturação das principais células da medula, as chamadas células hematopoiéticas (Travlos, 2006).

As *células hematopoiéticas*, conhecidas como células tronco hematopoiéticas (CTH), são os elementos que governam a hematopoese (Maksimov, 1909), processo de vital importância no corpo humano pelo qual são formadas as células sanguíneas (Gulati et al., 1988). As CTHs têm propriedades únicas, se diferenciando em todos os diferentes tipos de células maduras sanguíneas e teciduais se auto-renovam, no sentido de que durante a diferenciação são geradas outras CTHs, mantendo assim a chamada “piscina de células tronco” sempre em equilíbrio (Birbrair et al., 2016). Na hematopoese, três processos ocorrem a partir de células progenitoras: (1) a linfopoiese, governada pelas células linfoides progenitoras; (2.1) a mielopoiese e (2.2) a eritropoiese, governadas pelas células mieloides progenitoras (Figura 3). Linfopoiese é o processo no qual os linfócitos, especificamente as células B, células T e células NK (*natural killer*), que são a base do sistema imunológico adaptativo, se desenvolvem na MO. A mielopoiese diz respeito ao processo onde são formadas as células do sistema imune inato (granulócitos – basófilo, eosinófilo e neutrófilo; macrófagos) e as células responsáveis pela coagulação sanguínea (plaquetas). Por fim, a eritropoiese é o processo pelo qual são produzidos os glóbulos vermelhos (eritrócitos), células responsáveis pelo fornecimento de oxigênio e retirada de gás carbônico dos órgãos e tecidos do corpo humano (Bartl, 2013). As células resultantes desses três processos, somadas às CTHs, formam a chamada medula vermelha, que, junto da medula amarela, compõem toda a MO, sendo a proporção de cada parcela variável com a idade do indivíduo. Por exemplo, em crianças o processo hematopoiético é mais ativo devido à uma maior parcela da medula vermelha, o que não ocorre em idosos, na qual essa parcela foi substituída pela medula amarela (Bartl et al., 1982).

Figura 3 – Hematopoese humana normal: processo de diferenciação das CTHs em múltiplas linhagens de células sanguíneas.



Fonte: As peças de artes utilizadas nessa figura foram fornecidas pela *Servier Medical Art* (<http://smart.servier.com>). *Servier Medical Art* pela *Servier* é licenciada sob uma licença *Creative Commons Attribution 3.0 Unported*.

A heterogeneidade da MO, no que diz respeito às propriedades e composições da MEC, fornecendo uma microestrutura mecânica e uma bioquímica adequada para o crescimento, diferenciação e manutenção das funções das células tronco (Akhmanova et al., 2015), e distribuição celular, assim como a complexidade do sistema microvascular, criam sítios hematopoiéticos específicos que governam o comportamento das CTHs. Estes recebem o nome de nichos.

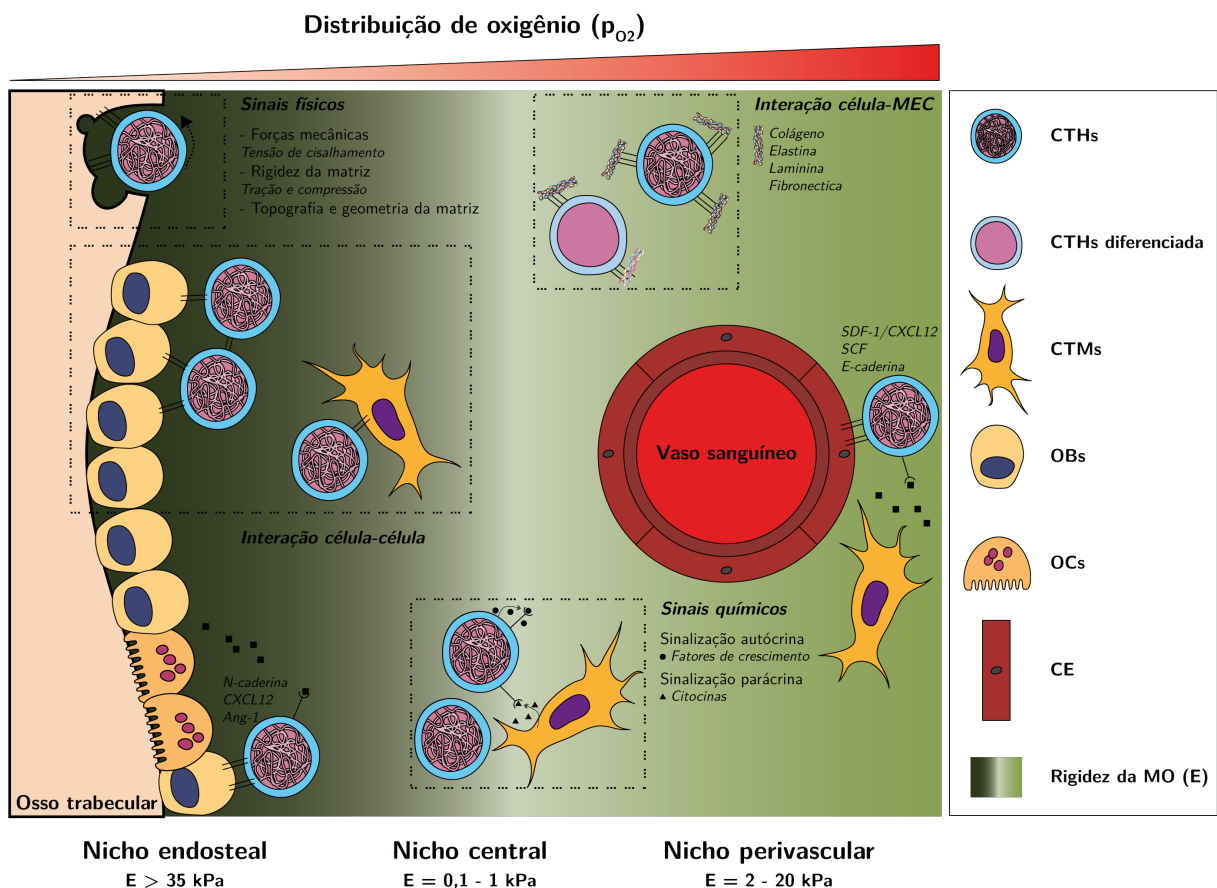
2.1.2 Sítios hematopoiéticos: nichos da medula óssea

O conceito de nicho foi primeiramente cunhado por Schofield (1978) que, em suas palavras, conceituou: “O ambiente celular que retém as células-tronco, chamarei de ‘nicho’ de célula-tronco. Enquanto a célula-tronco permanecer fixa, sua maturação posterior é impedida e ela continua indefinidamente a se replicar como uma célula-tronco...”. Como apresentado por Vishwakarma and Jeffrey (2017), a hipótese desses nichos postulada por

Schofield pode ser resumida em premissas principais: (1) um lugar anatômico específico; (2) um sítio que fornece sinais para a manutenção, auto-renovação e inibe a diferenciação das células-tronco; (3) um local limitado em espaço, controlando assim o tamanho da piscina das células-tronco; e (4) um sítio que permite a reprogramação de uma célula mais madura para um estado de célula-tronco. Raymond Schofield conjecturou que a existência e o destino das células-tronco dependem imprescindivelmente do espaço onde vivem e das interações íntimas com as células vizinhas (Schofield, 1978). Do ponto de vista histórico e científico, esse trabalho, postulando a existência dos nichos, foi o precursor de diversos estudos que expuseram a importância desses sítios para as funções de diversos tecidos e órgãos do corpo humano, em especial o sistema hematopoiético da MO (Morrison and Scadden, 2014).

Como resultado dos esforços para descrever a MO, três nichos especializados, anatomicamente determinados, foram definidos como sítios fundamentais para a manutenção e regulação das CTHs e CTHs progenitoras: endosteal, central, e perivascular (Figura 4).

Figura 4 – Ilustração esquemática dos componentes dos sítios das CTHs na MO: biologia e sinais bioquímicos, físicos e mecânicos do microambiente.



Fonte: Adaptado de Ingavle et al. (2019) e Raic et al. (2019). As peças de artes utilizadas nessa figura foram fornecidas pela *Servier Medical Art* (<http://smart.servier.com>). *Servier Medical Art* pela *Servier* é licenciada sob uma licença *Creative Commons Attribution 3.0 Unported*.

A caracterização desses nichos é baseada nos diversos estímulos que as CTHs experimentam no microambiente da MO, oriundos de uma microarquitetura e composição da MEC e uma disposição espacial e temporal dos componentes celulares e de biomoléculas (Zhang et al., 2019).

2.1.2.1 Características geométricas e biomecânicas

Confinados na cavidade medular, que apresenta, como já reportado, um tamanho que varia entre 300 e 600 μm , os nichos da MO estão dispostos sequencialmente, cada um estendendo-se por um espaço com dimensões na ordem de 100–300 μm , desde que exista um sinusoide como fonte de sinais mecânicos e bioquímicos (Glaser et al., 2020).

O microambiente da MO é formado por uma matriz estromal tridimensional com composições e características específicas. As propriedades mecânicas e os componentes que formam a MEC, como apresentado na Figura (4), são fundamentais para a identificação dos nichos da MO. O endosteal apresenta uma rigidez entre 35–40 kPa (Buxboim et al., 2010), sendo formado por colágeno tipo I e IV, osteopontina e fibronectina (Nilsson et al., 2005). A rigidez da região perivascular apresenta valor na ordem de 2–10 kPa (Engler et al. (2004)), logo, menos rígida do que a endosteal, e é formada por colágeno tipo IV, fibronectina e laminina (Siler et al., 2000). O nicho central é definido como o menos rígido dos três, tendo uma rigidez de aproximadamente 0,3 kPa (Shin et al., 2014), sendo formado por laminina, fibronectina, heparina e ácido hialurônico (Nilsson et al., 1998).

Em um contexto biológico, o que torna relevante a constituição de cada nicho é um mecanismo celular conhecido como mecanotransdução. Esse mecanismo fornece às células a capacidade de transformar estímulos mecânicos, governados pelas proteínas transmembrânicas, como as integrinas e N-caderinas (Argentati et al., 2019), em sinais bioquímicos por meio da biotensegridade celular, definida como o equilíbrio entre a tensão elástica das células e a integridade plástica de sua estrutura, que regula as forças e a atuação no citoesqueleto, desempenhando papel chave na regulação da expressão gênica das células (Ingber, 1997, 2003b), modificando assim as suas funções (Eyckmans et al., 2011; Jansen et al., 2015; Wolfenson et al., 2019).

No microambiente da MO, as propriedades biofísicas e mecânicas, além da composição da MEC, e a tensão de cisalhamento gerada pelo escoamento do fluido intersticial, são sinais vitais. Em especial, quanto aos estímulos causados pela tensão de cisalhamento, eles são menores nos interstícios do que na corrente sanguínea (Rutkowski and Swartz, 2007). Por exemplo para condições fisiológicas, o fluido intersticial estimula as CTMs com tensões na ordem de 0,01–0,1 Pa, ordens de grandeza menores do que a experimentada pelas células nas artérias (Kim et al., 2014).

Esses estímulos desencadeiam respostas biológicas das células que são reguladas pelo mecanismo de mecanotransdução, levando à indução de uma diferenciação em diversas

linhagens (*e. g.* osteogênica, cardiovascular, adipogênica e hematopoiética), migração celular, além da modificação da morfologia, da proliferação e do comportamento celular no microambiente (Vishwakarma and Jeffrey, 2017).

2.1.2.2 Células específicas e elementos bioquímicos

Principal componente do sistema hematopoiético, as CTHs estão dispostas de forma não homogênea ao longo dos nichos: aproximadamente 15% estão distribuída no nicho endosteal, enquanto os outros 85% estão presentes no nicho central e perivascular (Méndez-Ferrer et al., 2020).

O endóstio é formado exclusivamente por células de linhagens ósseas, especificamente os OBs e OCs (Ellis and Nilsson, 2012; Lucas, 2017), responsáveis pela regeneração e absorção óssea, respectivamente (Crane et al., 2017). Habitado pelas células do endóstio e as células estromais, especificamente as CTMs, o nicho endosteal mantém e regula as CTHs por meio de proteínas transmembrânicas, tais como a N-caderina, e por meio de moléculas chaves de sinalização, SDF-1/CXCL12 (*Stromal cell-derived factor 1/C-X-C motif chemokine 12*) e Ang-1 (*angiopoietin-1*), e diversas citocinas e quimiocinas. Esse sítio estimula a quiescência¹ (Calvi et al., 2003) das CTHs e, conseqüentemente, a prevalência das CTHs de longa duração (Taichman et al., 1996). Por causa desse caráter de manutenção celular, o processo hematopoiético que ocorre nesse nicho é chamado de regenerativo (Méndez-Ferrer et al., 2020).

O nicho central é formado por adipócitos, macrófagos e fibroblastos (Ellis and Nilsson, 2012; Lucas, 2017), e é responsável por desempenhar um papel de suporte na hematopoese (Nelson and Roy, 2016).

Por último, o nicho perivascular, sítio altamente vascularizado, é caracterizado por conter as CTMs, células perivasculares e endoteliais (Lucas, 2017; Belyavsky, 2019). Ao contrário do que ocorre no nicho endosteal, no perivascular existe a prevalência de CTHs de baixa duração que são estimuladas para diferenciação e expansão (He et al., 2014), onde as células sanguíneas são produzidas diariamente (Méndez-Ferrer et al., 2020). O suporte que as células de nicho fornecem é baseado nas biomoléculas e citocinas expressas, como as E-caderina e SCF (*Stem cell factor*) e SDF-1/CXCL12, respectivamente (Bello et al., 2018). A ativação das células CTHs quiescentes resulta em uma movimentação do nicho endosteal para o perivascular, e, por fim, à indução da migração para a circulação sanguínea (Yoon et al., 2012; Gori et al., 2015).

É digno de nota que, devido às propriedades biomecânicas e bioquímicas, cada nicho estimula as CTHs para processos hematopoiéticos diferentes. No endosteal, o destino

¹ Estado reversível em as células não se dividem, mas mantêm a habilidade de reativar a proliferação celular

da hematopoese é preferencial à linfopoese, enquanto que nos nichos central e perivascular, ocorre preferencialmente o processo de mielopoese (Méndez-Ferrer et al., 2020).

2.1.2.3 Distribuição de oxigênio nos nichos

Na MO, um sinal bioquímico fundamental regula a hematopoese e o crescimento e desenvolvimento das CTHs: a concentração de oxigênio. Em condições normais, ou atmosféricas, a concentração de oxigênio, normalmente referenciada como tensão de oxigênio p_{O_2} , é de 21%. Entretanto, os fluidos que irrigam os órgãos e tecidos do corpo humano apresentam, em sua maioria, uma condição de baixa oxigenação. Essa condição é chamada de hipóxia. Naturalmente, a MO e os seus nichos são caracterizados como um microambiente em hipóxia, com os níveis de O_2 entre 1–6% (Eliasson and Jönsson, 2010; Kim et al., 2021). A condição de hipóxia é fundamental para a manutenção das CTHs de longa duração, que estão em estado de quiescência (Nwajei and Konopleva, 2013; Belyavsky, 2019). Além disso, estimula a auto-renovação e a capacidade de desempenhar as funções de célula tronco e expansão das CTHs (Kocabas et al., 2015). A hipóxia celular é regulada pelo HIF-1 α (*Hypoxia-inducible factor*) (Nwajei and Konopleva, 2013; Wielockx et al., 2019).

Contudo, o oxigênio não é distribuído homogeneamente nos microambientes dos nichos da MO. Reportado por Parmar et al. (2007), a configuração anatômica e fisiológica da MO que induz uma menor concentração de oxigênio no nicho endosteal, com um aumento gradual na direção do nicho vascular, é um dos modelos biológicos mais utilizados para se estudar o comportamento das CTHs na MO. (Eliasson and Jönsson, 2010; Nwajei and Konopleva, 2013; Kumar et al., 2018; Ingavle et al., 2019; Wielockx et al., 2019).

Sendo assim, o destino das CTHs é dependente das propriedades dos nichos, que são representados por um microambiente 3D complexo que estimula as células por meio de sinais biofísicos e bioquímicos e por fatores produzidos pelos vários tipos celulares que compõem a MO (Raic et al., 2019).

2.1.3 Microambiente leucêmico da medula óssea

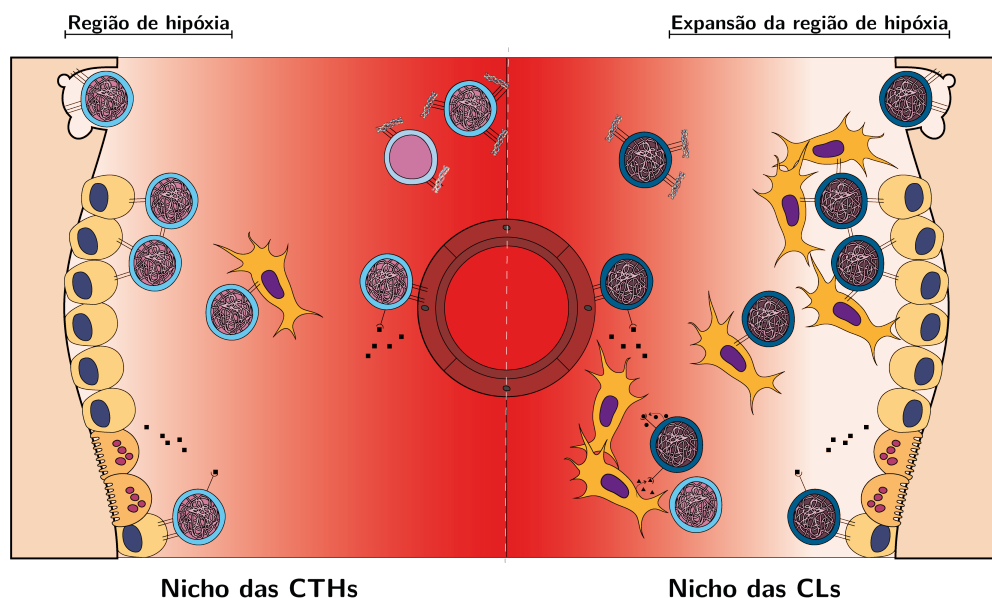
No corpo humano, desordens hematológicas causadas por uma combinação de eventos genéticos e fatores do ambiente geram patologias que podem alterar os processos hematopoiéticos da MO (Hutter, 2010). A leucemia é um câncer no qual o processo de diferenciação das células sanguíneas é interrompido em um estágio proliferativo, gerando assim células anormais, ou imaturas, chamadas de blastos ou células tronco leucêmicas (CTL), que se expandem continuamente pela MO (Sell, 2005). Por exemplo, a LLA é uma anomalia na proliferação e diferenciação dos linfócitos B (B-LLA) e T (T-LLA) nos nichos da medula óssea, sendo que a desordem da B-LLA corresponde a 80% de todos os casos (Chiarini et al., 2016). Com a expansão, as CTLs então começam a preencher

os nichos das CTHs, sequestrando o microambiente da MO, inibindo assim a produção de células saudáveis sanguíneas e do sistema imune, comprometendo todo o processo fisiológico hematopoiético (Wang and Hasserjian, 2018).

Tal como as CTHs, o comportamento e a sobrevivências das CTLs também são regulados por meio das interações com os elementos dos nichos da MO (Calvi et al., 2003; Nilsson et al., 2005): (1) as citocinas (*e. g.*, CXCL12, SDF-1, SCF) liberadas pelas células de nicho, por exemplo CTMs e OBs, são fatores chave na mediação da localização e entrada das CTLs no ambiente dos nichos, além de contribuir positivamente para a sobrevivência e quiescência das células, influenciando na resistência à quimioterápicos (Tabe and Konopleva, 2014; Houshmand et al., 2019); (2) as adesões célula-MEC, mediadas pelas integrinas, e as célula-célula, mediadas pelas N-caderina e E-caderina, são fundamentais para o suporte da auto-renovação, proliferação e impedimento da diferenciação, também contribuindo para a proteção das células contra intervenções quimioterápicas (Nwajei and Konopleva, 2013; Tabe and Konopleva, 2017); e (3) a hipóxia, que pelo HIF-1 α , afeta o metabolismo celular e a quiescência das CTLs, tal como, positivamente, a resistência à quimioterapia (Tabe and Konopleva, 2014, 2017; Chiarini et al., 2016).

Situada nos nichos endosteal, central e perivascular, as CTLs também são capazes de modular o microambiente da MO, criando os chamados nichos leucêmicos (Figura 5), santuários que fornecem proteção contra quimioterápicos e aumentam a resistência à drogas (Tabe and Konopleva, 2017).

Figura 5 – Nicho da células tronco hematopoiéticas (CTHs) e das células tronco leucêmicas (CTLs): distribuição de oxigênio e formação de novas regiões de hipóxia.



Fonte: Adaptado de Nwajei and Konopleva (2013). As peças de artes utilizadas nessa figura foram fornecidas pela *Servier Medical Art* (<http://smart.servier.com>). *Servier Medical Art* pela *Servier* é licenciada sob uma licença *Creative Commons Attribution 3.0 Unported*.

No nicho endosteal, as CTLs interagem com as CTMs e células ósseas, rearranjando a estrutura do microambiente, construindo uma barreira que dificulta a troca de sinais e limita as células de nicho. Além disso, outro aspecto fundamental da fisiologia da MO é modificado: nos nichos das células leucêmicas ocorre a expansão da região de hipóxia (Nwajei and Konopleva, 2013). Ambas modulações do microambiente da MO contribuem para a desordem hematológica, impedindo que alguns procedimentos terapêuticos, como tratamentos com drogas, consigam acessar esse novo nicho, protegendo assim as CTLs, permitindo sua sobrevivência e manutenção dos processos básicos para o crescimento e expansão (Riether et al., 2015).

2.2 *Organ-on-a-Chip*: da Cultura Celular 2D à Biomimetização de Órgãos em Dispositivos Microfisiológicos

2.2.1 Plataformas de cultura celular: modelos 2D e 3D

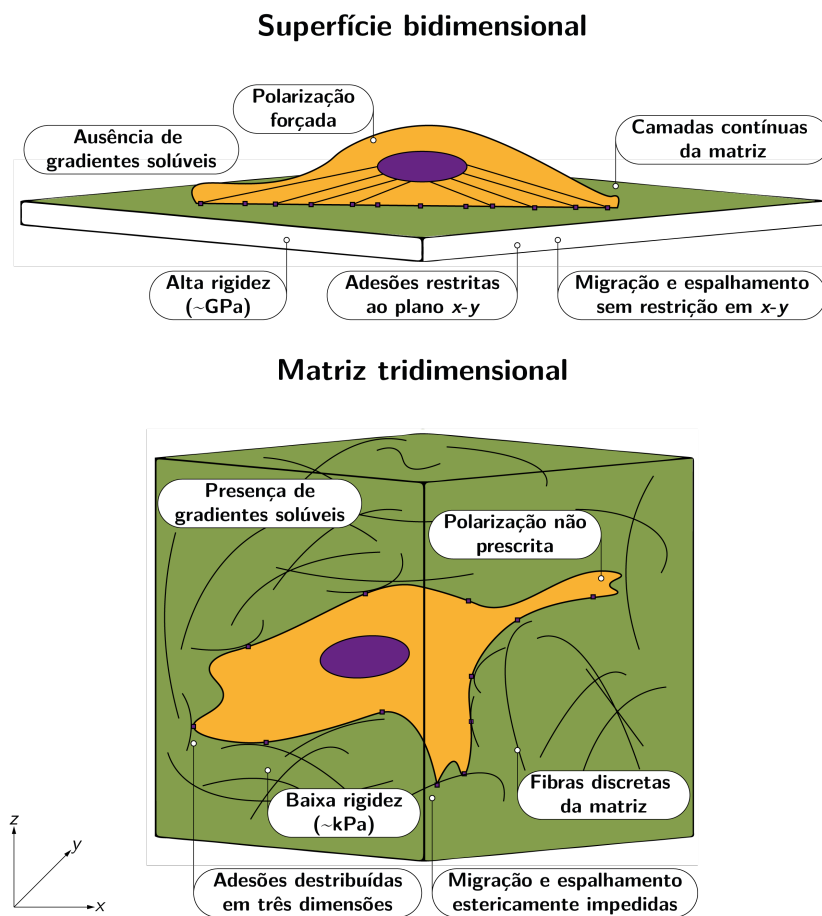
Ao longo do último século, o estudo do comportamento celular utilizando métodos *in vitro* foi de fundamental importância para a criação e consolidação do conhecimento sobre a biologia celular. Um dos trabalhos pioneiros do estudo das células em plataformas *in vitro* 2D baseou-se na avaliação do crescimento de células eucarióticas e a origem de fibras nervosas (Harrison, 1910).

Em culturas 2D, de modo geral, as células são cultivadas em monocamadas, com populações homogêneas, sobre superfícies muito rígidas (*e. g.* vidro e poliestireno, com rigidez na ordem de GPa), e com um fornecimento uniforme de substâncias (*e. g.* oxigênio, nutrientes e fatores de crescimento), resultando na homogeneidade da proliferação e expansão celular (Baker and Chen, 2012). Em termos práticos, a geometria dessa plataforma de cultura e a facilidade para o acesso, manuseio, cultivo e repique, a tornaram atrativa para o campo clínico e nas pesquisas biológicas (Duval et al., 2017). Contudo, as características de cultura nas plataformas 2D as transformam em base para método muito simplificado da representação *in vitro* dos aspectos anatômicos e fisiológicos do microambiente celular *in vivo*, como por exemplo, a microarquitetura, os sinais mecânicos e bioquímicos e as interações célula-MEC e célula-célula, falhando na biomimetização realista dos tecidos e órgãos (Hoarau-Véchet et al., 2018). Alguns aspectos fundamentais podem ser listados: (1) ausência de um gradiente de substâncias; (2) polarização forçada; (3) camadas contínuas da matriz; (4) adesões restritas ao plano $x-y$; e (5) migração e espalhamento em $x-y$ sem restrição (Baker and Chen, 2012; Duval et al., 2017). Do ponto de vista do comportamento das células, nessas condições o fenótipo por elas expresso difere do esperado para microambientes *in vivo*. Isso altera completamente o comportamento celular e as funções desempenhadas, o que significa dizer que os resultados obtidos a partir de estudos experimentais *in vitro*, como por exemplo o processo de entrega de drogas e

análises toxicológicas (Joshi, 2016), não podem ser extrapolados para modelos *in vivo* (Wang et al., 2015).

Procurando responder às questões levantadas pelas culturas utilizando as plataformas 2D, utiliza-se ensaios em animais (Hoarau-Véchet et al., 2018). Os modelos animais permitem o cultivo de células em um microambiente celular completo, com a possibilidade de se escolher regiões específicas de interesse para a realização dos estudos. Entretanto, nesses modelos, além dos problemas éticos envolvidas na utilização de animais (Antoni et al., 2015), a farmacocinética e farmacodinâmica, além da resposta do sistema imune e interações tecidos-órgãos, são válidas para uma fisiologia que difere daquela dos seres humanos (Shanks et al., 2009), o que impede uma evolução completa no estudo comparativo das células humanas *in vitro* e *in vivo*. Nesse contexto, as plataformas 3D surgem como um método intermediário entre as plataformas 2D e os modelos animais, eliminando a pobre mimetização do microambiente celular e as diferenças relatadas para as espécies, humana e animal (Hoarau-Véchet et al., 2018). Na Figura (6), são apresentadas as diferenças entre as plataformas 2D e 3D.

Figura 6 – Microambiente celular 2D e 3D: sinais biomecânicos e bioquímicos.



Fonte: Adaptado de Baker and Chen (2012).

A metodologia 3D pode ser definida como a cultura de células em ambientes tridimensionais, que biomimetizam a microarquitetura de tecidos e órgãos, possibilitando o crescimento das células em uma matriz extracelular tridimensional (Huh et al., 2011). Esses ambientes tridimensionais podem ser modelados utilizando duas abordagens: hidrogéis e *scaffolds*. Os hidrogéis são estruturas reticuladas formadas pela polimerização de polímeros ou proteínas, quimicamente ou fisicamente, definidos como um sólido microporoso. Exemplo de hidrogéis são o alginato, colágeno, fibrinogênio, Matrigel, polietileno glicol e o poli (ácido lático-co-glicólico). Os *scaffolds* são estruturas 3D macroporosas bem definidas, sendo caracterizados por meio da sua geometria, propriedades mecânicas e composição. Exemplo de *scaffolds* são os formados por hidroxiapatita, poliestireno e estrutura óssea (Rosalem et al., 2020).

Um dos primeiros trabalhos envolvendo plataformas 3D foi realizado por Ehrmann and Gey (1956), que avaliaram o crescimento de células em uma estrutura tridimensional de colágeno. As abordagens mais comuns na utilização dos modelos 3D é a representação do microambiente pelos agregados celulares e esferóides simulando a matriz extracelular (Sutherland et al., 1971; Kawaguchi et al., 2013). Diferentemente da plataforma de cultura 2D, a abordagem 3D fornece uma microestrutura do MEC mais fiel à que as células experimentam *in vivo*, influenciando na interações célula-célula, célula-MEC e na disponibilidade de substâncias do microambiente (Edmondson et al., 2014). Alguns pontos-chaves são facilmente enumerados: (1) presença de gradientes de substâncias; (2) polarização não prescrita; (3) fibras discretas da matriz; (4) adesões distribuídas em três dimensões; (5) migração e espalhamento estericamente impedidas; e (6) baixa rigidez, na ordem de kPa (Baker and Chen, 2012; Duval et al., 2017). Os modelos 3D comumente melhor capturam esse comportamento pelo fato do fenótipo que as células expressam nessas plataformas ser mais similar ao *in vivo*. Isso fica mais claro quando se compara com a plataforma 2D de cultura celular os fenômenos como proliferação, diferenciação, apoptose e migração celular (Edmondson et al., 2014), além de processos fisiológicos relacionados ao teste de drogas ou secreção de fatores de crescimento (Mroue and Bissell, 2013).

Entretanto, mesmo com os grandes avanços na biomimetização do microambiente celular por meio das plataformas 3D de cultura, essa metodologia ainda apresentava deficiências cruciais para a mimetização das características fundamentais do funcionamento dos órgãos e tecidos vivos. Exemplos disto são a falta da representação da interação tecido-tecido, de gradientes bioquímicos e biofísicos e de estímulos físicos gerados pelo escoamento de fluido ou deformação da matriz, que governam a mecanotransdução celular (Ingber, 2003a; Breslin and O'Driscoll, 2013) e que são muito importantes no funcionamento e desenvolvimento dos órgãos (Mammoto et al., 2013). Nesse cenário, uma tecnologia utilizada no campo das ciências exatas, baseada em uma hidrodinâmica em microescalas, foi adaptada. Essa tecnologia é conhecida como microfluídica.

2.2.2 Introdução aos sistemas microfluídicos

O nascimento da microfluídica está intrinsecamente relacionado ao surgimento e aplicação da microtecnologia. O início da história da microtecnologia é frequentemente referido ao ano de 1959, quando o professor Richard Feynman, em sua palestra visionária intitulada “*There’s Plenty Room at the Bottom*”, teorizou o conceito de miniaturização de processos e estruturas (Feynman, 1992). Estimulada pelas provocações feitas por Feynman, a comunidade acadêmica trabalhou no desenvolvimento da microtecnologia, até que no início da década de 90, sob o rótulo de *miniaturized total chemical analysis systems* (μ TAS), o campo da microfluídica se tornou uma ferramenta exponencial para o estudo da química e das ciências biológicas (Manz et al., 1990).

A microfluídica, nas palavras de Nguyen et al. (2006), é “a ciência e engenharia de sistemas no qual o comportamento do fluido difere da teoria convencional de escoamento primeiramente devido a menor escala de comprimento do sistema”. No campo de microtecnologia, de acordo com o definido por Azizipour et al. (2020), a microfluídica consiste em “compartimentos de manuseio de fluidos em microescala como canais, válvulas, reservatórios, membranas... que permitem análises bioquímicas integradas, automatizadas, paralelizadas e miniaturizadas de uma forma consistente e fácil”. De modo geral, essa plataforma trata de escoamentos em microcanais com dimensões na ordem de micrômetros e volumes de trabalho entre 10^{-9} – 10^{-18} litros (Whitesides, 2006), com uma física aplicada à microescala e diferentes processos de microfabricação (Beebe et al., 2002).

Devido às suas características naturais, os microdispositivos fluídicos apresentam uma miríade de vantagens fundamentais em comparação com as plataformas convencionais de cultura celular: (1) flexibilidade de projeto; (2) controle preciso dos parâmetros experimentais; (3) redução no volume das amostras; (4) integração de microestruturas; (5) redução no tempo de análises; (6) manuseio mais eficiente da cultura celular; (7) realização da cultura celular na presença de escoamentos bem estabelecidos; (8) acoplamento de sensores para análise em tempo real (Brugarolas, 2016; Sosa-Hernández et al., 2018). Como consequência das suas características, a microfluídica é uma tecnologia de fácil operação e com baixo custo-benefício, o que também torna possível a otimização na logística laboratorial.

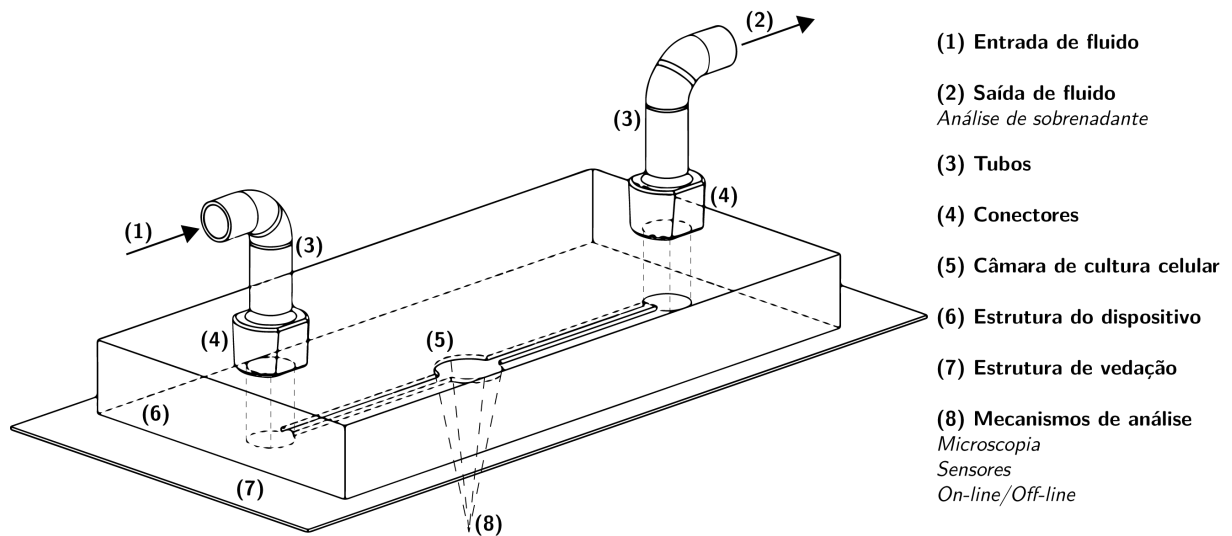
No cenário biológico, a característica inovadora mais importante relacionada à utilização da tecnologia microfluídica, a cultura celular em perfusão, é um aspecto chave para a regulação dos sinais mecânicos e bioquímicos, que são diferenciais quando comparados às plataformas 2D e 3D convencionais. A perfusão regula a concentração de substâncias no microambiente celular no tempo e no espaço (Dhumpa and Roper, 2012), como por exemplo o oxigênio, nutrientes e fatores de crescimento fundamentais para a manutenção das funções celulares, removendo também os resíduos celulares, que quando concentrados, podem prejudicar a cultura. Além disso, a perfusão é responsável por estimular as células

com sinais mecânicos, como por exemplo a tensão de cisalhamento, que, governados pelos mecanismos de mecanotransdução e mecanossensação, são responsáveis por regular o fenótipo celular e, conseqüentemente, as suas funções (Christoffersson, 2018). Alguns exemplos são os efeitos na diferenciação (Ando et al., 1987) e migração celular (Polacheck et al., 2011, 2013).

As principais características do projeto de um sistema microfluídico (Figura 7), adaptando a sintetização completa apresentada no trabalho de Christoffersson (2018), podem ser descritas como:

A microfluídica é um biorreator contínuo com células residindo em uma câmara de cultura celular que é conectada ao sistema de perfusão pelos canais adjacentes. A perfusão é fornecida por uma fonte operando fora do microdispositivo, conectada por meio de um tubo, ou diretamente no microdispositivo, ou integrada no microdispositivo. O meio de cultura de células é continuamente perfundido através do dispositivo com renovação constante de meio novo, recirculado da saída para a entrada ou alternando para frente e para trás. A análise das células pode ser realizada *in situ* ou por análise *off-line*. Finalmente, o dispositivo pode ser esterilizado para evitar contaminação e compatível com as condições padrão da incubadora (normalmente 37°C, 5% CO₂, 95% umidade).

Figura 7 – Projeto genérico de um sistema microfluídico.

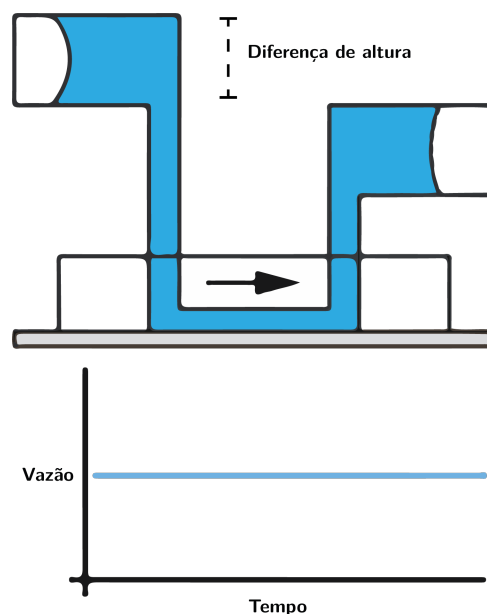


Fonte: Adaptado de Christoffersson (2018).

No projeto do sistema microfluídico existe um aspecto especial no que diz respeito à entrada e saída de fluidos: os mecanismos de perfusão. Devido à variedade de fenômenos fluidodinâmicos que estão envolvidos nos microambientes celulares, esses mecanismos são escolhidos especificamente para a representação de cada processo. Um dos métodos mais utilizados são os baseados no escoamento gerado pela gravidade. Esse método envolve o uso de reservatórios de fluido com diferentes alturas de coluna de líquido que podem ser

mantidas variáveis ou fixas (Figura 8). O sistema de escoamento gerado pela gravidade apresenta um funcionamento unidirecional, com escoamentos que podem chegar a ordem de nL/s (Byun et al., 2014), sendo função da densidade do fluido e da diferença de elevação entre os reservatórios. Devido a magnitude das vazões possíveis, esse sistema permite experimentos de curta e longa duração. Ademais, uma das suas principais vantagens é a ausência, ou diminuição drástica, da formação de bolhas, que são extremamente prejudiciais, por vezes fatais, para as células e devendo ser evitadas para a manutenção da integridade do estudo (Sung and Shuler, 2009b; Sung et al., 2010).

Figura 8 – Esquema de escoamento dirigido pela gravidade utilizado em microfluídica para a cultura de células em microdispositivos: representação da montagem e da característica do escoamento.



Fonte: Adaptado de Byun et al. (2014).

Todas essas características tornaram a microfluídica uma excelente ferramenta para pesquisas das mais diversas áreas da biologia, como, por exemplo, a cultura de células (Xiong et al., 2014), pesquisas sobre câncer (Pappas, 2016) e células tronco (Ertl et al., 2014) e teste de drogas (Neužil et al., 2012). Essa flexibilidade da tecnologia de microfluídica em projetar modelos diversos, capazes de obterem soluções eficientes para a mimetização da fisiologia dos microambientes, é resultado das características intrínsecas do comportamento dos fluidos nos microcanais, mas principalmente da evolução dos métodos de fabricação e tratamentos superficiais, que potencializaram o desenvolvimento e utilização da microfluídica (Chakraborty, 2010; Svendsen and Castillo-León, 2015; Song et al., 2018; Convery and Gadegaard, 2019).

2.2.2.1 Microfabricação em microfluídica: materiais, tratamentos superficiais e métodos

A microfabricação dos dispositivos de microfluídica é realizada em diversos materiais, como por exemplo o silício, vidro, hidrogel, o papel e os polímeros (Ren et al., 2013). No campo das pesquisas biológicas, o atual cenário indica a utilização dos polímeros como material base preferencial para o projeto dos microdispositivos.

Os polímeros são macromoléculas formadas por um arranjo linear, ramificado ou reticulado de pequenas unidades químicas, que são denominadas monômeros. Esses monômeros podem se organizar, por meio de um processo chamado de polimerização, em cadeias homogêneas (processo de polimerização por condensação) ou heterogêneas (processo de polimerização por adição) (Billmeyer, 1984). A polimerização pode gerar cadeias poliméricas com estruturas diversas, pelas ligações de natureza física, como as forças de van der Waals e de natureza química, como as ligações covalentes, iônicas e as ligações de hidrogênio (Osswald and Menges, 2012), o que resulta em materiais que apresentam propriedades mecânicas e físicas variadas. Devido a isso, os polímeros foram divididos, de acordo com as suas propriedades, em materiais plásticos, elastômeros e fibras (Ebewele, 2000; Callister and Rethwisch, 2014).

No campo da microfluídica, os polímeros mais utilizados são os plásticos e elastoméricos. Em aplicações no campo da engenharia, os materiais plásticos são classificados de acordo com o seu comportamento termomecânico, usualmente sendo subclassificados em termorrígidos e termoplásticos (Ebewele, 2000). Nos polímeros termorrígidos, a solidificação (polimerização) acontece por meio de um processo químico de cura, formando uma estrutura em rede, que faz com que após a formação do polímero, ele não possa ser remodelado por calor e pressão (Osswald and Menges, 2012). Esses polímeros podem apresentar rigidez mecânica por volta de 2,0–2,7 GPa (Ren et al., 2013) e uma boa estabilidade dimensional após o processo de formação da estrutura. Para aplicações no campo da microfluídica, apresentam propriedades vitais como a transparência óptica, o que permite o acesso instrumental ao interior dos dispositivos, e uma alta compatibilidade aos solventes. Os polímeros termorrígidos também permitem a construção de canais em estruturas 3D e de altíssima precisão (Zheng et al., 2010) e com dimensões mínimas de 100 nm (Ren et al., 2013). Entretanto, têm um alto custo e baixa permeabilidade aos gases oxigênio e gás carbônico ($1,005 \times 10^{-17}$ – $3,35 \times 10^{-16}$ mol.m/m².s.Pa), o que dificulta, ou até impossibilita, culturas estáticas de longa duração, não sendo as escolhas principais para a pesquisa biológica. E por isto, os termoplásticos e os elastômeros ocupam um lugar de destaque.

Os termoplásticos, diferentemente dos termorrígidos, são polímeros no qual o processo de polimerização ocorre quando o material é resfriado (Ren et al., 2013). A sua estrutura pode ser formada por cadeias lineares e/ou ramificações de moléculas e o processo de polimerização é reversível, podendo o material ser conformado diversas vezes (Osswald

and Menges, 2012). Eles apresentam um módulo de elasticidade entre 1,4–4,1 GPa. Tal qual os termorrígidos, os polímeros termoplásticos também apresentam uma alta transparência óptica, biocompatibilidade e compatibilidade com solventes, com exceção dos solventes orgânicos (Ren et al., 2013). O processo de fabricação padrão é a termomoldagem, pelo qual canais microfluídicos podem ser construídos tridimensionalmente com dimensões de até 100 nm, características análogas às dos termorrígidos. Contudo, os termoplásticos também apresentam uma baixa permeabilidade ao oxigênio o que também limita a sua utilização em experimentos de cultura estática de células de longa duração. Alguns dos principais materiais termoplásticos utilizados para a construção dos dispositivos microfluídicos são o poli(metil metacrilato) (PMMA), poliestireno (PS) e policarbonato (PC) (Becker and Gärtner, 2008). Na Tabela 1, são apresentadas as principais propriedades dos termoplásticos mais utilizados na microfluídica.

Tabela 1 – Panorama das propriedades dos principais termoplásticos utilizados na microfabricação de dispositivos microfluídicos.

Propriedades	Termoplásticos			Referências
	PMMA	PS	PC	
Módulo de elasticidade (GPa)	2,24–3,24	2,28–3,28	2,41–4,41	Callister and Rethwisch (2014)
Coefficiente de Poisson	0,37–0,44	0,330–0,475	0,35–0,6	Callister and Rethwisch (2014)
Densidade (g/cm ³)	1,19	1,05	1,30–1,58	Callister and Rethwisch (2014)
Menor dimensão dos canais [†]		≈ 0,1 μm		Ren et al. (2013)
Canais em multicamadas [†]		Fácil construção		Ren et al. (2013)
Termoestabilidade [†]		Média a alta		Ren et al. (2013)
Compatibilidade com solventes [†]		Media a alta		Ren et al. (2013)
Hidrofobicidade [†]		Hidrofóbico		Ren et al. (2013)
Permeabilidade ao oxigênio ^{†*}		10 ⁻¹⁷ –10 ⁻¹⁵		Ren et al. (2013)
Transparência óptica		Media a alta		Ren et al. (2013)

[†]Propriedades gerais para todos os termoplásticos

*Unidade da permeabilidade de oxigênio: (mol.m/m².s.Pa)

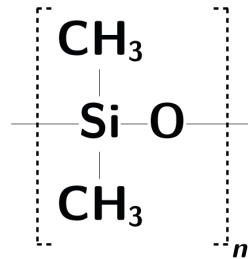
Fonte: Adaptado de Ren et al. (2013).

Os elastômeros são polímeros de estrutura levemente reticulada formada pela cura térmica (Ren et al., 2013). Devido a sua composição e organização estrutural, os elastômeros são sólidos com baixo módulo de elasticidade (≈ 0,0005 GPa) (Osswald and Menges, 2012). A polimerização dos elastômeros pode ocorrer por meio de um processo químico chamado de vulcanização ou pelo processo de reticulação da estrutura de monômeros (Osswald and Menges, 2012).

O elastômero mais utilizado para a microfabricação dos dispositivos é o dimetil polissiloxano (PDMS - *polydimethylsiloxane*) (Berthier et al., 2012), representado pela fórmula molecular (C₂H₆OSi)_n (Figura 9). O módulo de elasticidade desse elastômero

varia entre 300–500 kPa (Nge et al., 2013), e com uma densidade entre 0,965–1,03 g/cm³ (Becker and Gärtner, 2008; Izdihar et al., 2021).

Figura 9 – Representação esquemática da unidade de repetição e da estrutura linear do PDMS.



Fonte: Autor.

O PDMS ganhou destaque no campo da microfluídica por ser um material de baixo custo, ótimas propriedades ópticas (transparentes na faixa de comprimentos de onda de 230–700 nm), permeabilidade ao oxigênio ($\approx 2,68 \times 10^{-13}$ mol.m/m².s.Pa) e outros gases, e alta flexibilidade na manufatura de estruturas planares ou tridimensionais, propriedades que combinadas são vitais para a sua aplicação às pesquisas biológicas (Jo et al., 2000; Sosa-Hernández et al., 2018).

Fundamental para a caracterização dos polímeros são suas propriedades de superfícies, funções da composição e organização das suas moléculas. A química da superfície dos polímeros termorrígidos, termoplásticos e elastoméricos é variada e definida por grupos funcionais que dependem dos monômeros que os compõem. O PMMA é representado por um grupo acrilato. O PS e PC, por um grupo fenil. O PDMS tem um grupo silanol governando a química da sua superfície (Nge et al., 2013). Esses grupos funcionais são responsáveis por definir como a superfície dos polímeros interage com substâncias e componentes externos. Uma das caracterizações dessas interações são por meio dos comportamentos hidrofóbico ou hidrofílico que os materiais podem apresentar.

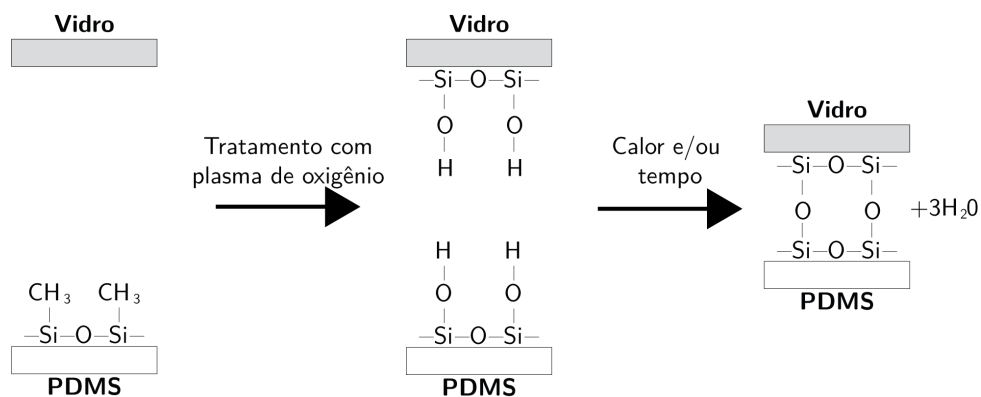
Hidrofobicidade é uma propriedade material na qual não existe interação entre as moléculas (grupos funcionais) e a água. Moléculas hidrofóbicas não apresentam elétrons livres, configuração chamada de apolar, enquanto a água é uma molécula que tem elétrons livres, recebendo a denominação de molécula polar. Materiais apolares interagem com solventes apolares (orgânicos) e outros tipos de moléculas. Por outro lado, materiais hidrofílicos apresentam a superfície com moléculas polares, habilitando assim a interação com as moléculas da água (Ben-Naim, 1980).

A superfície dos materiais termorrígidos e termoplásticos apresenta comportamento hidrofóbico (Ebewele, 2000; Nge et al., 2013; Ren et al., 2013). Essa propriedade também é detectada nos elastômeros, incluindo o PDMS (Hillborg and Gedde, 1999; Ren et al., 2013). A hidrofobicidade induz fenômenos físico-químicos nas paredes dos microcanais, chamados

de absorção e a adsorção. O fenômeno de absorção está relacionado com a capacidade da matriz sólida do material absorver pequenas moléculas hidrofóbicas presentes no fluido, enquanto que o fenômeno de adsorção consiste na capacidade de adesão de biomoléculas hidrofóbicas na parede dos canais. Com o acúmulo dessas moléculas dentro ou na superfície do dispositivo, a concentração de substâncias de interesse pode variar no tempo e no espaço, comprometendo as experimentações (Gokaltun et al., 2017). Sendo assim, é essencial que os efeitos característicos da hidrofobicidade da superfície dos canais sejam diminuídos ou, na melhor situação, eliminados (Song et al., 2018). A modificação dessas propriedades é feita pelos chamados tratamentos superficiais.

No campo da microfluídica, especificamente no que concerne à modificação superficial do PDMS com foco na microfabricação, o tratamento por plasma² é o mais comumente aplicado (Zhou et al., 2010), utilizando uma grande variedade de gases, como o argônio e o nitrogênio, com uma especial atenção ao plasma de oxigênio (Tan et al., 2010). O tratamento por plasma de oxigênio é baseado na ativação da superfície do material, pelo qual os grupos metil ($-\text{CH}_3$) são substituídos por grupos polares funcionais, principalmente os hidrofílicos silanóis ($-\text{Si}-\text{OH}$) (Borók et al., 2021), modificando as suas propriedades de hidrofóbicas para hidrofílicas (Tan et al., 2010; Hillborg et al., 2000). A ativação da superfície utilizando o plasma de oxigênio é realizada em um equipamento à vácuo chamado câmara de plasma, sob condições controladas de pressão (vácuo), tempo de exposição e potência (Borók et al., 2021). O plasma de oxigênio também é responsável pela remoção de contaminantes da superfície, e, principalmente, promove a ligação estrutural do PDMS com o silício, o próprio PDMS e o vidro (Kim and Jeong, 2011; Borók et al., 2021). Na Figura 10, são apresentadas as etapas do processo de ativação de superfícies do PDMS e vidro utilizando o plasma de oxigênio.

Figura 10 – Etapas do processo de ativação de superfícies utilizando o plasma de oxigênio.



Fonte: Adaptado de Borók et al. (2021).

² Estado da matéria em que as partículas estão parcialmente ou completamente ionizadas, em um estado gasoso

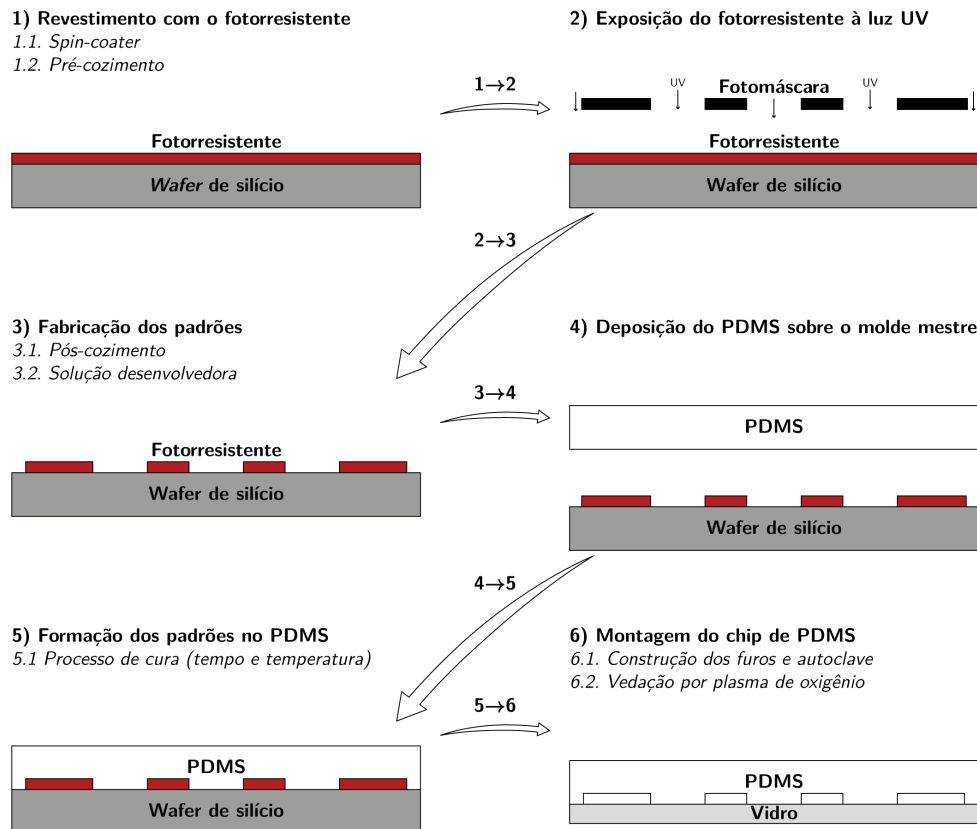
A promoção da ligação do PDMS com outras estruturas, como por exemplo o vidro, é uma das principais etapas do método de microfabricação de dispositivos baseada nesse material: a *soft-lithography*.

A *soft-lithography* é um termo que se refere à fabricação de padrões estampados em elastômeros (Xia and Whitesides, 1998) e, como definido por Brittain et al. (1998):

Soft-lithography é um conjunto de técnicas que expandem e complementam a fotolitografia convencional permitindo a criação de superfícies curvas e possibilitando a formação de estruturas em nano escala usando uma variedade de materiais de uma forma relativamente simples.

A fotolitografia convencional é uma técnica de geração de padrões estruturais por intermédio da projeção de formas contidas em materiais opacos, tipicamente máscaras finas de cromo, em materiais fotorresistentes, como por exemplo o SU-8 (Qin et al., 1996). As principais etapas dessa técnica são o projeto dos padrões e a fabricação do molde mestre. A fotolitografia é a primeira etapa do procedimento de microfabricação de estampas de PDMS utilizando a técnica da *soft-lithography* (Qin et al., 2010). Na Figura 11, é apresentado o detalhamento dos passos do procedimento.

Figura 11 – Esquema ilustrativo do processo de microfabricação de dispositivo em PDMS. Litografia (1-3). *Soft-lithography* (4-6).

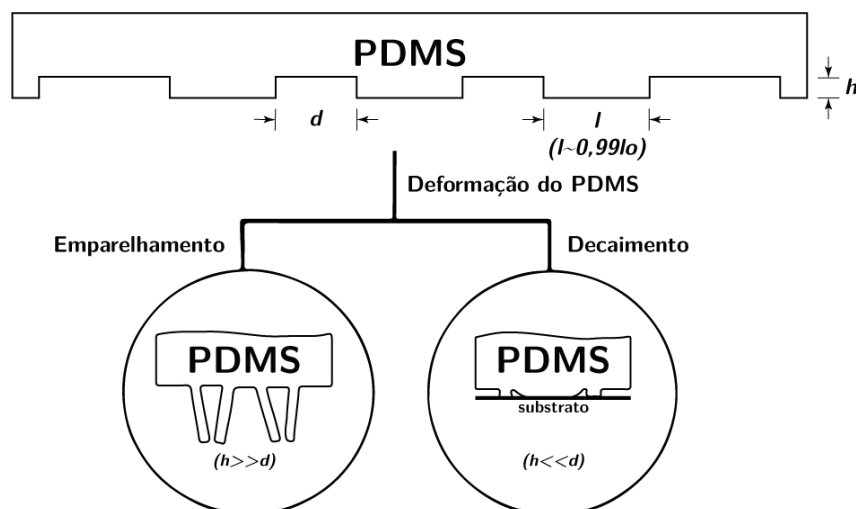


Fonte: Adaptado de Qin et al. (2010) e Shin et al. (2012)

A *soft-lithography* é uma técnica de baixo custo, de fácil aprendizado e aplicação, se tornando acessível aos mais variados níveis de usuários. Essa técnica permite a construção de superfícies, planares ou não-planares, e estruturas 3D com resolução de até 30 nm e tamanho mínimo de 10–100 nm (Xia and Whitesides, 1998). Além disso, a utilização de materiais elastoméricos para a fabricação dos dispositivos é uma característica chave desta técnica devido as suas aplicações biológicas e propriedades mecânicas. O termo elastômero se refere a materiais mecanicamente menos rígidos (*soft*), o que define também o nome dessa técnica (Whitesides et al., 2001). Entretanto, essa propriedade pode prejudicar a construção dos canais e de estruturas formadas pelos elastômeros. Em dispositivos construídos com PDMS, dois problemas podem ocorrer devido ao baixo módulo de elasticidade do material: colapso lateral e decaimento.

Na Figura 12, é apresentado um esquema dessas duas falhas que podem ocorrer no dispositivo. Os parâmetros d , h , l e l_0 representam respectivamente a largura do canal, a altura do canal, a largura das estruturas internas e a largura inicial das estruturas internas. O fenômeno do colapso lateral está associado a uma geometria em que a altura do canal é muito superior a largura, de modo que a inequação $h/d > 5$ seja válida. De outro modo, o fenômeno de decaimento ocorre quando a largura do canal é muito superior à altura, de modo que $h/d < 0,5$ seja satisfeita. Para que esses fenômenos sejam evitados, existem razões de aspecto ótimas entre os parâmetros geométricos que podem ser utilizadas para o desenvolvimento dos dispositivos (Qin et al., 2010). Baseado nisso, as seguintes relações são apresentadas como sendo ideais para o projeto das dimensões dos dispositivos de microfluídica: $h/d > 0,05$ e $0,5 > h/l > 5$.

Figura 12 – Esquema ilustrativo para os fenômenos que podem ocorrer dependentes das geometrias do dispositivo: emparelhamento e decaimento.



Fonte: Adaptado de Xia and Whitesides (1998).

Como já discutido anteriormente, a microfabricação baseada na *soft-lithography*, no procedimento padrão, é dependente da técnica de fotolitografia convencional para a produção dos moldes mestre. Entretanto, na última década, um método alternativo vem sendo utilizado para a microfabricação dos moldes para o estudo em hidrodinâmica e cultura celular (Bonyár et al., 2010; Comina et al., 2014; Razavi Bazaz et al., 2019, 2020; Ferraz et al., 2020): a impressão 3D.

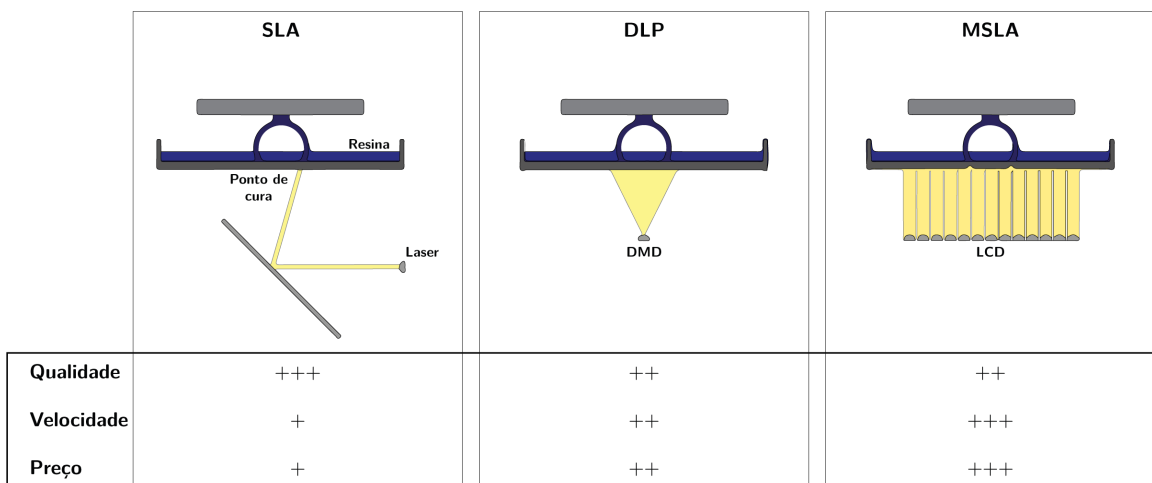
A impressão 3D, também conhecida como manufatura aditiva, é uma tecnologia que teve o seu surgimento guiado pela evolução dos computadores (*softwares* e *hardwares*), o desenvolvimento de novas técnicas de desenho assistido por computador (CAD - *Computer Aided Design*), o desenvolvimento da tecnologia dos lasers, a otimização das técnicas de impressão, a criação de controladores programáveis lógicos e o desenvolvimento de novos materiais, principais motivos para a implementação com sucesso da tecnologia de impressão 3D (Gibson et al., 2015). A impressão 3D é definida pela ISO/ASTM 52900:2018 (ISO/ASTM 52900:2018, 2018) como uma tecnologia que aplica o princípio de modelagem aditiva, criando geometrias 3D por adição sucessiva de material, pelas etapas que se seguem: (1) desenho CAD da geometria 3D; (2) importação do arquivo .stl; (3) corte da geometrias em um número definido de seções transversais 2D; e (4) impressão das seções 2D *layer-by-layer* (camada por camada), até a obtenção da a geometria 3D original (Ho et al., 2015).

Na história da impressão 3D na microfluídica, uma das principais tecnologias tem sido a modelagem por deposição (FDM - *Fused Deposition Modeling*). Na FDM, as estruturas são produzidas em materiais termoplásticos e elastômeros, materiais relativamente baratos. Entretanto, por vezes o tempo de impressão é longo, além de apresentarem uma baixa precisão (Ho et al., 2015). Nesse cenário, a manufatura 3D utilizando resinas fotocuráveis vem ganhando espaço nos últimos anos. A sua principal vantagem em relação a FDM são as altas resoluções na impressão, o que possibilita a criação de microdispositivos com estruturas detalhadas e com alta qualidade. As resinas fotocuráveis são formadas por três componentes principais: (1) monômeros e oligômeros, moléculas responsáveis pela formação de longas cadeias de polímeros; (2) agentes de reticulação, moléculas que conectam diversos pontos da cadeia polimérica; (3) fotoiniciadores, responsáveis por guiar as reações entre os monômeros e com os agentes de reticulação. Em suma, a impressão 3D de resinas fotocuráveis ocorre com a polimerização de monômeros e oligômeros após a aplicação de uma fonte de luz adequada³. Atualmente, três tecnologias apoiadas em resinas fotocuráveis estão entre as mais comuns no campo da microfluídica: a estereolitografia (SLA - *Stereolithography*), DLP (*Digital Light Projector Screen*) e a LED-LCD (MSLA - *Masked Stereolithography*).

³ Resin 3D Printers: SLA, DLP and LED-LCD. **filament2print**, 2020. Disponível em: https://filament2print.com/gb/blog/99_impessoras-3d-resina-SLA-DLP-LED-LCD. Acesso em: 06 de dezembro de 2021

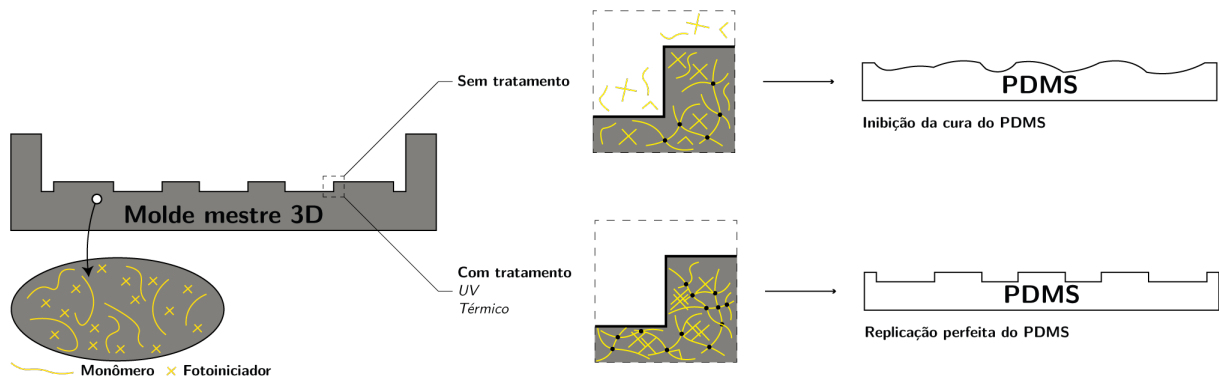
A SLA é uma tecnologia de impressão 3D desenvolvida por Hull (1984) baseada na impressão de estruturas 3D pela cura de um material fotorreativo utilizando luz UV (Amin et al., 2016). Essa cura é um processo de polimerização da resina *layer-by-layer*, por meio da exposição à luz UV gerada por uma fonte de laser, criando camadas 2D (Bártolo, 2011) do material polimerizado. Na tecnologia DLP, ao invés de uma fonte de laser varrer a superfície, um conjunto de microespelhos, denominados DMD (*Digital Micromirror Device*), associados a um conjunto de lentes, projetam a imagem sobre a resina, realizando assim a cura. Por fim, na MSLA os mecanismos utilizados são quase os mesmos do que na DLP, no entanto, ao invés de utilizar o DMD, um dispositivo LCD emite luz por meio dos seus pixels, que podem bloquear ou permitir a passagem de acordo com a máscara da estrutura³. Na Figura 13, é apresentado um esquema ilustrativo de cada uma das tecnologias apresentadas.

Figura 13 – SLS vs. DLP vs. MSLA.



Fonte: Adaptado da página da filament2print³.

Contudo, apesar das possibilidades que surgiram com a utilização das resinas para a impressão 3D de microdispositivos, alguns aspectos acerca do material precisam ser considerados. Dois componentes principais das resinas fotocuráveis, especificamente os monômeros e os fotoiniciadores, desempenham papel fundamental, positivo ou negativo, no processo de cura. Quando presentes na superfície do molde mestre, esses componentes inibem a cura completa do elastômero, prejudicando assim a réplica dos padrões no PDMS (Figura 14). Em seu trabalho recente, Venzac et al. (2021) apresentaram um estudo sobre esse fenômeno, os motivos e como evitá-los. Considerando diferentes combinações de tempo tanto para a pós-cura em luz UV, como ao aquecimento dos moldes, eles reportaram a eliminação dos componentes inibidores para diferentes resinas comerciais. É digno de nota mencionar que, devido às diversas composições das resinas, se faz necessário a utilização de diferentes protocolos para se atingir o mesmo objetivo (Venzac et al., 2021).

Figura 14 – Inibição da cura do PDMS em moldes 3D impressos.

Fonte: Adaptado de Venzac et al. (2021).

O resultado final foi a microfabricação de estruturas de PDMS com réplicas perfeitas do molde mestre. Além disso, o tratamento dos moldes após a impressão também se mostrou apropriado para a construção de microdispositivo que permitisse a cultura celular em um microambiente fisiológico, sem a presença de componentes citotóxicos (Ferraz et al., 2020).

Sendo assim, a utilização da tecnologia de impressão 3D em resinas fotocuráveis se torna uma expoente alternativa à fotolitografia na técnica de *soft-lithography*, possibilitando o projeto de dispositivos com uma gama de geometrias, configurações e uma flexibilidade natural da tecnologia de manufatura aditiva.

2.2.3 Tecnologia *Organ-on-a-Chip*

A evolução tecnológica e científica que a microfluídica causou na pesquisa biológica, avançando até as aplicações clínicas, a tornaram base para o desenvolvimento de novos modelos para o estudos da microestrutura, bioquímica, mecânica, e as funções de órgãos, além das interações célula-célula e célula-tecido, em plataformas representativas. Com o objetivo de biomimetizar os microambientes dos órgãos e tecidos do corpo humano em dispositivos únicos, a microfluídica foi combinada à engenharia de tecido, resultando no desenvolvimento de uma tecnologia chamada de *Organ-on-a-Chip* (OoC) (Huh et al., 2010). A tecnologia OoC é definida como um sistema biomimético utilizado para a cultura de células em um ambiente micrométrico que permite o escoamento contínuo de fluido, confinamento geométrico e controle dos estímulos do ambiente, a fim de modelar as funções patofisiológicas dos tecidos e órgãos humanos (Bhatia and Ingber, 2014; Esch et al., 2015). O mecanismo básico de desenvolvimento e funcionamento dos dispositivos OoC segue uma abordagem genérica que pode ser definida seguindo os seguintes passos (Zheng et al., 2016a): (1) identificação das propriedades estruturais e fisiológicas vitais para a representação do microambiente de cada órgão específico; (2) fabricação do dispositivo aplicando os aspectos chave identificados; e (3) medição e análise dos parâmetros funcionais de saída das células

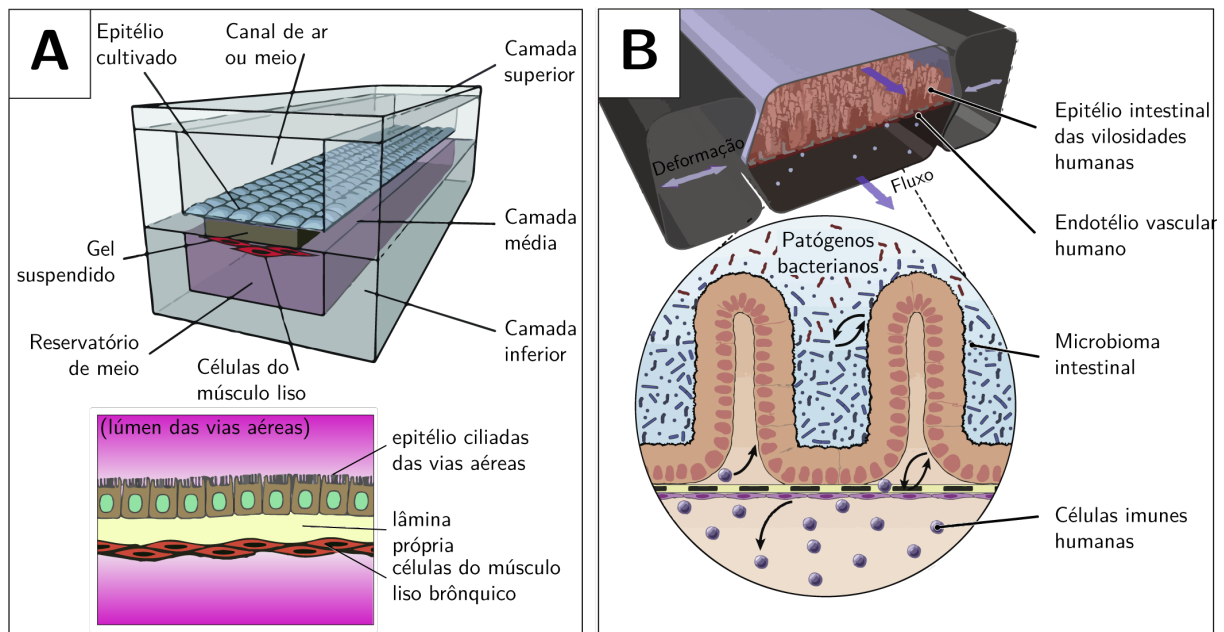
cultivadas. Essa abordagem científica para o estudo, desenvolvimento e confecção dos OoC fez com que estes apresentassem melhores características que os modelos convencionais, não só para a pesquisa biológica fundamental, mas também para os diagnósticos e tratamentos clínicos (Jiang et al., 2014).

Os OoC, por serem uma aplicação especializada da tecnologia de microfluídica, apresentam as mesmas, e ainda mais, vantagens em relação aos métodos tradicionais de cultura de célula e mimetização de tecidos e órgãos. Dividindo-as em aspectos técnicos/experimentais e biológico/biomédico, pode-se exemplificar as funcionalidades dessa nova tecnologia. Em relação ao primeiro, as vantagens típicas são: (1) flexibilidade de desenvolvimento dos dispositivos; (2) controle e flexibilidade experimental; (3) menor número de células necessárias para o estudo; (4) análise em tempo real e dentro do chip; (5) automação do dispositivo; (6) sistema de análises diretamente acoplado; (7) possibilidade de realizar a cultura em perfusão; e (8) co-cultura controlada (Aziz et al., 2017). Outra vantagem técnica de extrema importância é que, nos OoC, os tipos celulares podem ser posicionados precisamente e de modo controlável, o que facilita a integração de microscópios e sensores para ensaios analíticos (Zhang et al., 2018). No que diz respeito às vantagens de caráter biológico/biomédico, têm-se: (1) maior precisão na simulação da entrega e penetração de drogas com a utilização de uma estrutura 3D biomimetizada (Griffith and Swartz, 2006); (2) estudo das interações entre diferentes tipos celulares pelo controle de substâncias, tais como os nutrientes e fatores de crescimento e da composição da ECM (Sackmann et al., 2014); (3) controle de sinalizações mecânicas induzidas pela deformação dos tecidos e pelo fluxo fisiológico (Huh et al., 2011; Bhatia and Ingber, 2014); e (4) possibilidade de representação das funções fisiológicas dos órgãos, respostas farmacológicas e fenótipos celulares clinicamente relevantes (Esch et al., 2015).

A tecnologia OoC, por meio da sua capacidade de biomimetizar sinais mecânicos e bioquímicos, a interação de interface e a microestrutura dos tecidos e os gradientes fisiológicos de cada órgão, possibilitou a criação de modelos capazes de investigar e fornecer dados extremamente relevantes sobre os mecanismos fisiológicos básicos e as doenças a nível de órgãos e tecidos (Yum et al., 2014). Devido à gama de aplicações possíveis dos OoC, estas foram agrupadas em três tipos caracterizados pelos nichos de estudo apoiados nos seus mecanismos de funcionamento, nos quais os principais são baseados em membranas e estímulos mecânicos e na anatomia (Zheng et al., 2016a). Os baseados em membranas incluem os dispositivos *lung* (Figura 15A) (Humayun et al., 2018), *kidney* (Musah et al., 2017) e *gut* (Figura 15B) (Jalili-Firoozinezhad et al., 2018) *-on-a-chip*. Os dispositivos que fazem parte do segmento baseados na anatomia dos órgãos foram utilizados para a mimetização de componentes do corpo humano incluem os *blood vessel* (Zheng et al., 2012) e *splent* (Rigat-Brugarolas et al., 2014) *-on-a-chip*.

Um outro sistema para a representação do microambiente de órgãos do corpo

Figura 15 – Esquema ilustrativo da biomimetização de sítios específicos de órgãos do corpo humano em dispositivos OoC: (A) *Lung-on-a-chip*. (B) *Gut-on-a-chip*.



Fonte: Adaptado de Humayun et al. (2018) e Bein et al. (2018).

humano é o chamado *bone marrow-on-a-chip* (BMOaC). Entretanto, apesar da existência de alguns modelos que reportem resultados relevantes, a biomimetização da MO, por ser um dos órgãos de estrutura e diversidade celular mais complexas do corpo humano, ainda apresenta um desafio para a tecnologia OoC.

2.2.3.1 Biomimetização da medula óssea

Desde o surgimento do interesse em se estudar a MO em modelos *in vitro*, diversas abordagens pelas plataformas 2D e 3D foram utilizadas para a sua mimetização e do seu sistema hematopoético (Ham et al., 2019; Raic et al., 2019). Entretanto, devido à existência de um microambiente complexo formado por um variado conjunto de células e estímulos biofísicos e bioquímicos, os modelos *in vitro* não eram capazes de capturar as funções e os nichos das células hematopoéticas (Torisawa, 2019). Com o avanço da microfluídica e das tecnologias associadas, como a microfabricação e métodos em engenharia de tecidos, o desenvolvimento de plataformas OoCs forneceu novas ferramentas para a biomimetização da fisiologia e histologia da MO, possibilitando o estudo dos processos patofisiológicos em plataformas *in vitro* (Torisawa, 2019).

Considerando o papel chave da MO na manutenção do estado saudável ou doente, sua complexidade biológica e diversas funções no corpo humano, um crescente interesse científico na mimetização das funções e nichos de MO usando dispositivos OoCs aflorou nos últimos anos, e, especificamente nas últimas duas décadas, diversos modelos foram

projetados por intermédio de abordagens distintas. Nesse contexto, em uma revisão da literatura realizada por Rosalem et al. (2020), foram identificadas a evolução e o estado da arte dos OoCs para a representação da MO *in vitro*, com foco em pontos cruciais nesse desenvolvimento: (1) principais aplicações na mimetização da MO; (2) técnicas de microfabricação; (3) mecanismos de perfusão; (4) composição e biologia do microambiente mimetizado da MO; e (5) eficácia dos OoCs para a mimetização da MO.

As *principais aplicações na mimetização da MO* reportadas na literatura puderam ser classificadas em quatro categorias: (i) comportamento biológico na MO, focado na mimetização do microambiente saudável da MO sem distinção dos nichos e/ou representação da proliferação ou diferenciação; (ii) modelagem da MO patológica; (iii) teste de drogas na MO; e (iv) mimetização dos nichos da MO. Apesar do foco da maioria dos artigos ter o microambiente da MO saudável, vários deles propuseram o estudo de células oriundas de patologias, como por exemplo o mieloma múltiplo (Zhang et al., 2014; Khin et al., 2014; Zhang et al., 2015), a LLA (Bruce et al., 2015), a LMA (Sung and Shuler, 2009a; Sung et al., 2010; Aleman et al., 2019; McAleer et al., 2019) e a leucemia mieloide crônica (Miller and Shuler, 2016; Zheng et al., 2016b). Esses trabalhos indicam que o estudo da fisiopatologia da MO não-saudável e da investigação de novos protocolos de tratamentos, utilizando os dispositivos OoC, são preocupações emergentes na pesquisa biomédica.

Do ponto de vista fisiológico, os nichos são fundamentais para estruturar a MO como composta de regiões com propriedades e tipos celulares distintos (Bello et al., 2018), atuando de forma integrada e dinâmica. A “mimetização dos nichos da MO” foi considerada em poucos trabalhos e nenhum dos dispositivos propostos abordou todos os três nichos, de forma integrada ou não. Os principais nichos representados *in vitro* foram o endosteal (Zhang et al., 2014, 2015) e o perivascular (Carrion et al., 2010; Kotha et al., 2018; Marturano-Kruik et al., 2018). Mesmo com as dificuldades presentes na representação das diversas características físicas, químicas e biológicas dos nichos da MO (Braham et al., 2018), o que resultou na representação apenas desses sítios de forma isolada, mimetizar nichos individuais pode ajudar na compreensão de processos governados pelas características específicas de determinadas regiões e explicar alguns aspectos do comportamento celular no microambiente da MO.

Em relação às *técnicas de microfabricação*, o projeto dos OoC respeitou a necessidade de biocompatibilidade dos materiais (Ratner, 2011) e a manutenção de culturas a longa prazo (Li et al., 2015) em condições estáveis e controladas de O₂ e CO₂, nas quais quaisquer variações nesses gases são prejudiciais e modificam o comportamento das células. Outro aspecto importante considerado foi a possível formação de resíduos pela interação de componentes orgânicos e inorgânicos e as paredes do microdispositivo. Esses resíduos podem estimular mecanismos celulares, influenciando as suas respostas frente determinados tratamentos (Polini et al., 2014). Por fim, as propriedades ópticas, especificamente a

transparência dos materiais utilizados, são fundamentais para as tecnologias de obtenção de imagens, como por exemplo a microscopia de fluorescência, microscopia confocal e microscopia de contraste de fase. Neste cenário, a combinação de todas essas características é obtida utilizando a *soft-lithography* e o PDMS como material base. Essa técnica de microfabricação esteve presente em todas as aplicações reportadas para a biomimetização da MO em OoC, como por exemplo o desenvolvimento de um BMOaC humano vascularizado (Chou et al., 2020), o desenvolvimento de um modelo biomimético de tricultura microfluídica 3D (Bruce et al., 2015), o cultivo *in vitro* da medula viva com um nicho hematopoiético funcional (Torisawa et al., 2014, 2016) e a mimetização do nicho perivascular do osso humano (Marturano-Kruik et al., 2018).

Os *mecanismos de perfusão* mais utilizados foram as bombas peristáltica e de seringa, fornecendo um fluxo fisiológico que regula o suprimento de oxigênio, nutrientes e fatores de crescimento, tal como ocorre na MO *in vivo*. Esses mecanismos foram utilizados para estudos variados, como por exemplo mimetizar o perfil farmacocinético da droga no corpo humano (Sung and Shuler, 2009a; Sung et al., 2010), o desenvolvimento de um sistema microfluídico 3D para preservação das interações MO-células de múltiplo mieloma (Zhang et al., 2014, 2015) e o desenvolvimento de uma plataforma BMOaC humana com um sistema de perfusão recirculante integrado (Aleman et al., 2019).

No que diz respeito a *composição e biologia do microambiente mimetizado da MO*, um polímero natural foi o hidrogel mais utilizado para a reprodução da MEC da MO: o colágeno tipo I. Na Tabela 2, é apresentado um resumo das composições do microambiente mimetizado da MO.

Tabela 2 – Materiais utilizados para a mimetização da medula óssea.

Estrutura e tipos e material		Hidrogel	Scaffold
Matriz 3D	Revestimento de superfície		
Colágeno tipo I	Colágeno tipo I	•	
Alginato		•	
Matrigel		•	
Colágeno tipo I/fibrinogênio		•	
Colágeno tipo I/fibronectina	Colágeno tipo I/fibronectina	•	
<i>PGMatrix</i>		•	
Fibrina		•	
Gelatina de ácido hialurônico		•	
Pó de osso/colágeno tipo I		•	
Matriz óssea/colágeno tipo I			•
Hidroxiapatita			•
Osso descelularizado			•
Poliestireno			•
	Fibronectina	•	

Fonte: Adaptado de Rosalem et al. (2020).

O colágeno tipo I, caracterizado como um colágeno fibrilar, é o hidrogel mais

utilizado na bioengenharia para a produção de microambientes tridimensionais (Antoine et al., 2014). As suas propriedades mecânicas e estruturais dependem intrinsecamente da sua densidade, sendo reportado na literatura a seguinte relação com o módulo de elasticidade: 0,5 mg/mL (10 Pa); 2 mg/mL (300 Pa); 4 mg/mL (1200 Pa) (Polacheck et al., 2013; Lam et al., 2014). No trabalho de Bruce et al. (2015), a realização de experimentos utilizando colágeno tipo I com densidade 2 e 4 mg/mL, estudando as interações entre célula-MEC, foi um primeiro ensaio para futuras avaliações a cerca da resposta citotóxica e resistência a drogas como função das propriedades da matriz 3D de colágeno, influência reportada por Zustiak et al. (2014).

A biologia da MO foi também representada pelos tipos celulares específicos que compõem o estroma e o sistema hematopoiético normal e anormal, CTM, OB e CE, e CTH e CTL, respectivamente. Os estudos avaliaram co-cultura e culturas de células únicas. Mesmo a monocultura sendo importante para estudar o comportamento de tipos celulares específicos, sob condições *in vitro* controladas, o microambiente celular *in vivo* é composto por vários tipos de células e a interação célula-célula e célula-MEC são determinantes para o comportamento celular.

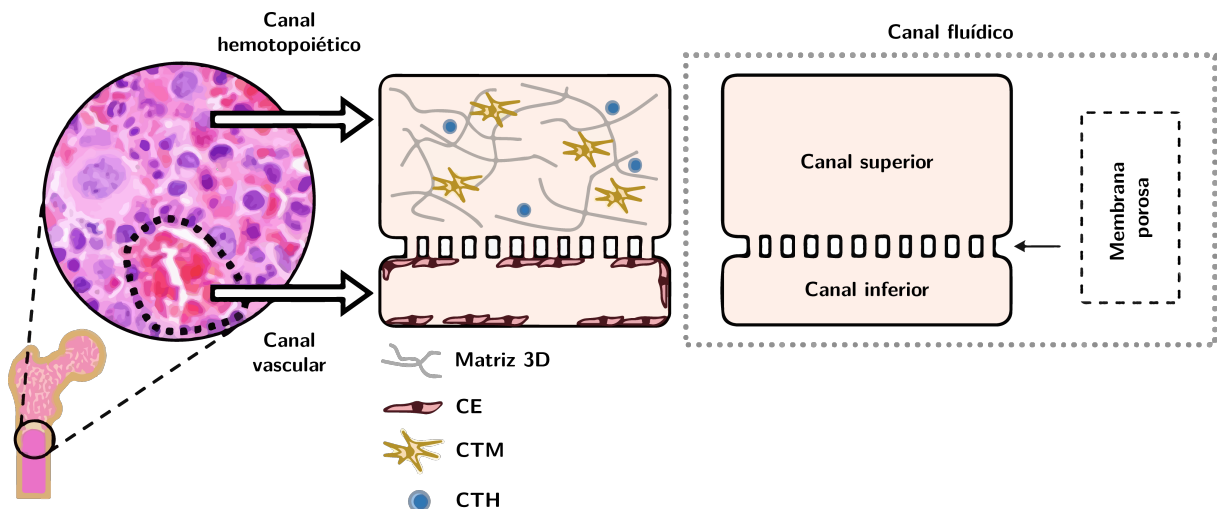
A mimetização do microambiente da MO de forma completa, considerando os principais tipos celulares e seus respectivos sítios mecânicos e biológicos (Akhmanova et al., 2015), é uma tarefa que exige diversas considerações em um sistema OoC, como por exemplo o ajuste do meio de cultura, suprimento de oxigênio, escoamento de fluido e propriedades estruturais. Alguns exemplos de aplicação foram para o projeto de um microambiente 3D perfundido para simular a LLA para estudo molecular e triagem de drogas (Houshmand et al., 2017), o projeto de um modelo de primeira passagem de absorção, metabolismo e excreção de drogas em humanos (Herland et al., 2020) e o fornecimento de características *in vitro* com base na fisiologia e estrutura da MO *in vivo*, melhorando a investigação dos efeitos das interações célula-célula e célula-matriz na iniciação e progressão do câncer em comparação com a cultura 2D e 3D estática (Bruce et al., 2015). Isso sugere a evolução dos métodos de cultura de células, além do desenvolvimento em engenharia de tecidos e microfluídica, permitindo a implementação desses modelos em sistemas *in vitro* do tipo OoC.

Por fim, para avaliar a *eficácia dos OoCs para a mimetização da MO*, os microdispositivos OoC foram categorizados pelas principais vantagens e melhorias em relação aos métodos convencionais de cultura de células: (i) matriz de hidrogel 3D com perfusão; (ii) co-cultura em matriz de hidrogel 3D; (iii) co-cultura em matriz de hidrogel 3D com perfusão; e (iv) co-cultura em *scaffold* 3D com perfusão. Os resultados reportados em Rosalem et al. (2020) evidenciam que, em comparação com a cultura estática 2D e 3D convencionais, as novas plataformas apresentaram uma melhora substancial na manutenção da cultura celular de curto e longo prazo, no comportamento celular e na resposta celular

aos fármacos. Em especial, Zhang et al. (2014, 2015) avaliaram a proliferação de células de múltiplos mielomas e a sua interação com um substrato representativo do tecido ósseo. Nesse microambiente foi possível detectar um arranjo 3D entre as células anormais e o tecido ósseo. Esse arranjo é responsável pelo fenômeno conhecido como “resistência a drogas mediada por adesão celular”, fundamental no estudo de drogas e no desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas (Damiano et al., 1999). Em um estudo análogo, Khin et al. (2014) avaliaram o efeito de quimioterápicos no mesmo tipo celular, reportando o aumento da viabilidade das células anormais quando cultivadas com células estromais da MO. O fenômeno de “resistência a drogas mediada por adesão celular” foi associado às interações entre as células do mieloma com as células estromais e a MEC, além dos fatores solúveis secretados.

Chou et al. (2020) desenvolveram um microdispositivo OoC para a biomimetização da MO considerando dois aspectos chaves: os vasos sanguíneos e um nicho hematopoiético padrão (Figura 16).

Figura 16 – Dispositivo *bone-marrow-on-a-chip*: representação do microambiente da medula óssea no osso humano e a sua mimetização nos respectivos canais (vista de seção do microdispositivo).



Fonte: Adaptado de Chou et al. (2020).

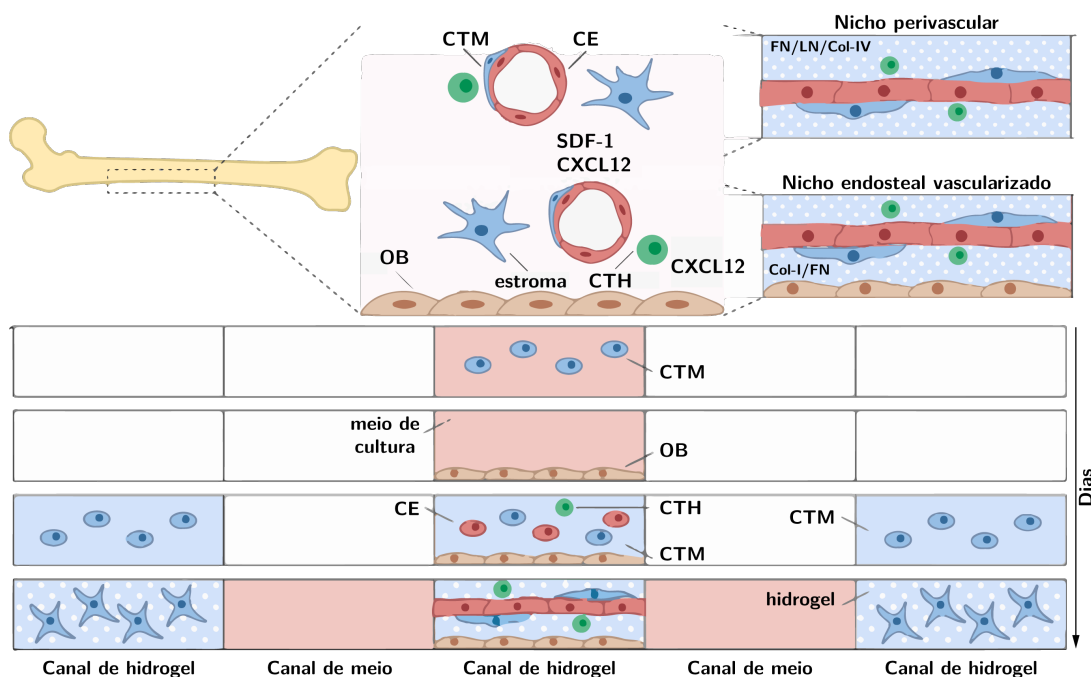
Os vasos sanguíneos estão representados por um canal vascular cultivado com CEs, o que possibilita a presença de fatores de crescimento secretados, responsáveis por regular o comportamento das CTHs (Sugiyama et al., 2006). O nicho hematopoiético está representado por uma matriz tridimensional formada por colágeno tipo I e fibrinogênio, cultivada por CTMs e CTHs. Esses canais são separados por uma membrana porosa de PDMS que simula as paredes dos vasos. A membrana de PDMS é responsável por regular a entrada de nutrientes e a distribuição de oxigênio na câmara de cultura, carregados por um escoamento de fluido. O nível de oxigênio foi calculado como sendo 75% da pressão atmosférica, homogêneo por toda a câmara de cultura. Os resultados reportados por

meio desse modelo para mimetização MO demonstraram que esse dispositivo representa uma abordagem para a predição das respostas patofisiológicas, podendo escalar para o descobrimento de novas técnicas terapêuticas e o desenvolvimento de novos modelos experimentais que sejam efetivos para a aplicação clínica dessa tecnologia.

A evolução e o estado da arte apresentados na revisão sistemática esmiuçaram o contexto da biomimetização da MO em sistemas OoCs. Entretanto, é digno de nota reportar três trabalhos extremamente relevantes que complementam o estado da arte desse campo.

Nelson et al. (2019), utilizando as técnicas fotolitografia e *soft-lithography* baseada em PDMS, desenvolveram um BMOaC considerando a co-cultura das principais células que regulam a vascularização e formam os multi nichos que compõem a MO: OBs, CEs, CTMs e CTHs (Figura 17). As células foram cultivadas em uma matriz de hidrogel à base de colágeno tipo I e IV, fibronectina e laminina, todos componentes existentes no microambiente da MO (Nelson and Roy, 2016). Os resultados mostraram que a plataforma desenvolvida foi capaz de mimetizar fielmente a MEC da MO, detectando-se uma contribuição significativa do nicho endosteal na sua fisiologia, influenciando na proliferação e migração das CTHs, além da resposta à radiação. Esse sistema microfisiológico surge como uma plataforma promissora para a pesquisa e desenvolvimento dos BMOaC em condições normais e anormais.

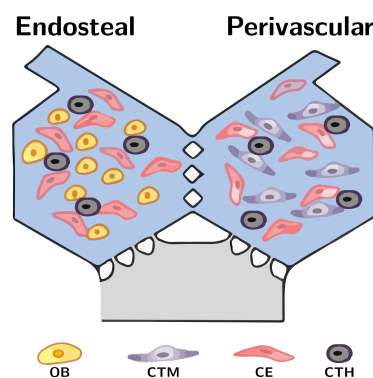
Figura 17 – Esquema ilustrativo do *multi-niche microvascularized human bone-marrow-on-a-chip*.



Fonte: Adaptado de Nelson et al. (2019).

Glaser et al. (2020) projetaram um microdispositivo formado por câmaras distintas e interligadas utilizando a microfabricação em *soft-lithography* e PDMS. As câmaras representam dois nichos da MO: o endosteal e o perivascular. No nicho endosteal, a cultura foi realizada com OBs e CTMs representando as células estromais da MO. A representação do nicho perivascular foi feito com CEs e CTMs representando as células estromais da MO. As CTHs foram cultivadas em ambos os nichos (Figura 18). As células foram cultivadas em uma matriz tridimensional formada por um hidrogel a base de fibrina e sob um escoamento intersticial (velocidade mínima: $4,48 \mu\text{m/s}$; velocidade máxima: $22,58 \mu\text{m/s}$; velocidade média: $17,7 \mu\text{m/s}$). A tensão de oxigênio estabelecida na cultura variou, temporalmente, entre 88,7–97,6%. Os autores reportaram que os sinais do microambiente permitiram que as CTHs, em uma cultura de longa duração, realizassem as suas funções tal como *in vivo*, incluindo a manutenção e diferenciação. A conclusão dos autores indica que essa nova plataforma BMOaC recapitula o microambiente da MO, possibilitando o estudo espaço-temporal dos fenômenos hematopoiéticos que ocorrem no corpo humano.

Figura 18 – Esquema ilustrativo do *bone marrow-on-a-chip*.

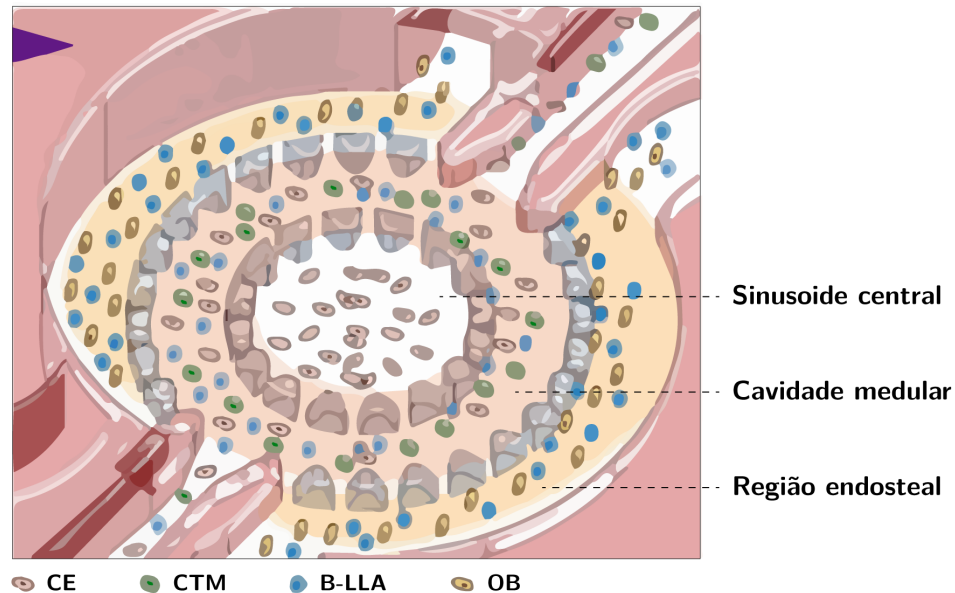


Fonte: Adaptado de Glaser et al. (2020).

Ma et al. (2020) desenvolveram uma plataforma OoC para o estudo do efeito de fármacos na leucemia linfóide aguda em nichos da MO biomimetizados. Projetando o microdispositivo em PDMS por intermédio das técnicas de fotolitografia e *soft-lithography*, os autores construíram três estruturas de cultivo e passagem de fluido que representaram o sinusóide central, a cavidade medular e a região endosteal. O sinusóide central foi cultivado com CEs sobre uma superfície tratada com gelatina. A cavidade medular foi cultivada com CEs, CTMs e B-LLAs em uma hidrogel 3D biomimético formado essencialmente por fibrina. A região endosteal foi cultivada com OBs e B-LLAs, também em uma matriz tridimensional formada por hidrogel de fibrina (Figura 19). O trabalho foi realizado com células humanas e modelos murinos. Os resultados do modelo *in vitro* da leucemia em um dispositivo indicaram a mimetização da patologia B-ALL em um microambiente heterogêneo da MO, pelas sinalizações que estimulam a quiescência e mantêm a sobrevivência desse tipo celular,

com influência significativa na resistência aos tratamentos quimioterápicos. A *leukemia-on-a-chip* surge como uma promissora ferramenta para a triagem em terapias e a predição da resposta celular em aplicações pré-clínicas.

Figura 19 – Esquema ilustrativo do *leukemia-on-a-chip*.



Fonte: Adaptado de Ma et al. (2020).

Apesar da evolução na mimetização dos microambiente da MO, demonstrada com propriedade nos estudos de Nelson et al. (2019), Glaser et al. (2020) e Ma et al. (2020), alguns aspectos fundamentais ainda não foram totalmente integrados em uma mesma plataforma: (1) a condição de hipóxia e o gradiente entre os nichos; (2) a presença de escoamento fisiológico; e (3) as diferenças nas propriedades mecânicas da MEC. As condições de oxigênio na MO têm um papel fundamental na regulação das células, e essa questão foi levantada por Chou et al. (2020) que apontaram a possibilidade de alteração da concentração de oxigênio para estudar o comportamento do CTHs em função da disponibilidade de oxigênio, e também por Houshmand et al. (2017), que relataram que a ausência da condição hipóxia é uma limitação em mimetizar os nichos MO.

Nessas circunstâncias, mesmo que o uso de modelos simplificados na representação da MO *in vivo* seja suficiente para o estudo de problemas específicos e menos complexos, devido a não replicação das dinâmicas de interações célula-célula e célula-MEC em multi nichos patofisiologicamente relevantes, a mimetização incompleta do órgão limita as suas aplicações clínicas. O avanço nesse campo está intimamente ligado ao desenvolvimento de novos modelos de OoCs, que permitam estudos mais completos acerca do comportamento das células da MO e um sistema mais eficiente para o estudo do tratamento em patologias da medula humana.

2.3 Modelagem Computacional em *Organ-on-a-Chip*: Fenômenos de Transporte e do Comportamento das Células

2.3.1 Fluidodinâmica

2.3.1.1 Equações de Navier-Stokes

A hidrodinâmica do escoamento em um volume de controle é descrita por equações derivadas dos princípios de conservação de massa e quantidade de movimento. A primeira equação é conhecida como equação da continuidade, e representa a conservação de massa em um domínio genérico:

$$\frac{\partial \rho}{\partial t} = -\nabla \cdot (\rho \mathbf{v}) \quad (2.1)$$

em que $\rho(\mathbf{x}, t)$ [kg/m³] é o escalar de massa específica do fluido, $\mathbf{v}(\mathbf{x}, t)$ [m/s] é o vetor de velocidades do fluido e ∇ é o operador *nabla* padrão, $\nabla \equiv \mathbf{i}\partial_x + \mathbf{j}\partial_y + \mathbf{k}\partial_z$ (Weber and Arfken, 2003). Em microdispositivos nos quais as velocidades do escoamento úteis são ordens de grandeza menores do que a da velocidade do som, o fluido pode ser tratado como incompressível, sendo então a Eq. 2.1 escrita da forma (Bruus, 2008):

$$\frac{\partial \rho}{\partial t} = \nabla \cdot (\rho \mathbf{v}) = \rho \nabla \cdot (\mathbf{v}) = 0 \quad (2.2)$$

$$\nabla \cdot \mathbf{v} = 0 \quad (2.3)$$

A segunda equação descritiva é conhecida como equação de movimento para um campo de velocidades euleriano e, por meio da segunda lei de Newton para um volume de controle, relaciona a taxa de variação de quantidade de movimento com os efeitos de associados à advecção, forças de pressão, forças viscosas e forças de corpo. A equação geral de movimento para um campo de velocidades euleriano é dada por:

$$\rho \frac{\partial \mathbf{v}}{\partial t} + \rho (\mathbf{v} \cdot \nabla) \mathbf{v} = \nabla \cdot \boldsymbol{\sigma} + \rho \mathbf{f}_{\text{ext}} \quad (2.4)$$

em que $\boldsymbol{\sigma}$ [N/m²] é o tensor de tensões de segunda ordem e \mathbf{f}_{ext} é uma força externa (*e. g.* \mathbf{g} [m/s²] – vetor do campo da gravidade). Para um fluido isotrópico e incompressível, o escalar de densidade $\rho(\mathbf{x}, t) = \rho$ é considerado constante, logo a Eq. 2.4 pode ser escrita como (Bruus, 2008):

$$\rho \left[\frac{\partial \mathbf{v}}{\partial t} + (\mathbf{v} \cdot \nabla) \mathbf{v} \right] = -\nabla P + \mu \nabla^2 \mathbf{v} + \rho \mathbf{f}_{\text{ext}} \quad (2.5)$$

sendo $P(\mathbf{x}, t)$ [N/m²] o escalar de pressão, μ [N.s/m²] a viscosidade dinâmica do fluido e ∇^2 o operador Laplaciano padrão, $\nabla^2 \equiv \partial_{xx} + \partial_{yy} + \partial_{zz}$ (Weber and Arfken, 2003).

Entendendo os termos envolvidos: (1) $\partial \mathbf{v} / \partial t$, representa a aceleração local do escoamento; (2) $(\mathbf{v} \cdot \nabla) \mathbf{v}$, representa a aceleração convectiva. Convecção é um processo físico no qual alguma propriedade é transportada pelo escoamento do fluido; (3) ∇P , descreve uma fonte interna de movimento para o fluido; (4) $\mu \nabla^2 \mathbf{v}$, descreve o termo difusivo. Difusão é um processo físico no qual alguma propriedade é transportada pelo movimento aleatório do fluido; e (5) f_{ext} , descreve uma fonte externa de movimento para o fluido. A equação (2.5), que descreve a evolução espaço-temporal de um fluido newtoniano incompressível, em conjunto com a equação da continuidade (Eq. 2.3), são conhecidas como Equações de Navier-Stokes.

O sistema acoplado formado pelas equações de Navier-Stokes (Eq. 2.5) é escrito em termos de quatro variáveis fundamentais: as componentes do campo de velocidade ($v_x(\mathbf{x}, t)$, $v_y(\mathbf{x}, t)$ e $v_z(\mathbf{x}, t)$) e o campo de pressão local $P(\mathbf{x}, t)$. Considerando que o número de incógnitas é igual ao número de equações, requisito para um sistema algébrico possível e determinado, a solução para problemas específicos depende apenas do ajuste das condições iniciais e de contorno. Nos dispositivos OoC, uma condição de contorno específica na interface fluido-parede é frequentemente definida. Desde que a parede do microdispositivo seja caracterizada como uma superfície sólida, uma condição de não-deslizamento representa essa interação. Em termos matemáticos, ela pode ser expressada da seguinte forma:

$$\mathbf{v}(\mathbf{x}, t)|_{\mathbf{x} \in \partial\Omega} = \mathbf{0} \quad (2.6)$$

em que $\partial\Omega$ representa a superfície interna dos canais do microdispositivo (Bruus, 2008).

Um outro ponto importante que deve ser considerado é a impossibilidade de se obter soluções analíticas para as equações de Navier-Stokes. Contudo, no estudo de alguns problemas específicos, existem aproximações que podem ser realizadas, levando a linearização das equações. Uma forma de avaliar a validade de alguma aproximação específica é reescrever a equação de Navier-Stokes como função de variáveis adimensionais: $\mathbf{x} = (L) \bar{\mathbf{x}}$; $\mathbf{v} = (v) \bar{\mathbf{v}}$; $t = (L/v) \bar{t}$; $P = (\mu v / L) \bar{P}$; $\partial / \partial t = (v / L) \partial / \partial \bar{t}$; $\nabla = (1 / L) \bar{\nabla}$; Substituindo essas novas variáveis na Eq. (2.5), desprezando as forças de campo, e rearranjando, temos:

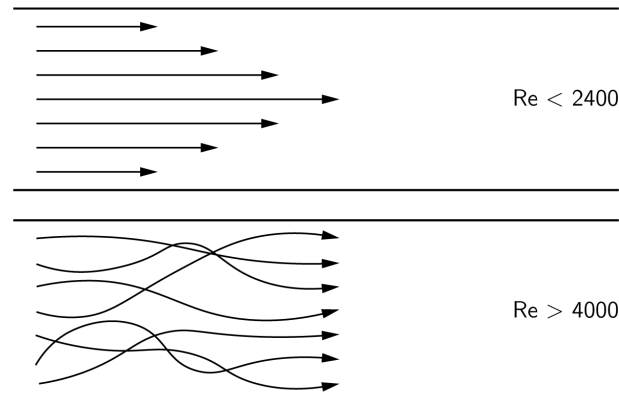
$$\text{Re} \left[\frac{\partial \bar{\mathbf{v}}}{\partial \bar{t}} + (\bar{\mathbf{v}} \cdot \bar{\nabla}) \bar{\mathbf{v}} \right] = -\bar{\nabla} \bar{P} + \bar{\nabla}^2 \bar{\mathbf{v}} \quad (2.7)$$

em que Re é o número de Reynolds (Re). O número de Reynolds é definido como a razão entre as forças inerciais e as forças viscosas em um escoamento:

$$\text{Re} \equiv \frac{\rho v^2 / L}{\mu v / L^2} = \frac{\rho v L}{\mu} = \frac{v L}{\nu} \quad (2.8)$$

sendo v [m/s] a velocidade característica, L [m] é o comprimento característico e ν [m²/s] é a viscosidade cinemática do fluido. Com base neste adimensional, o fluido apresenta dois regimes de escoamento: laminar ($\text{Re} < 2400$) e turbulento ($\text{Re} > 4000$) (Figura 20).

Figura 20 – Trajetórias de elementos fluidos em um escoamento: (a) regime laminar e (b) regime turbulento .



Fonte: Adaptado de Christoffersson (2018).

Para a modelagem matemática da fluidodinâmica em microdispositivos, é de fundamental importância o estudo de como as dimensões reduzidas influenciam parâmetros físicos do escoamento. Em microcanais, a razão entre a área de superfície e o volume útil aumenta drasticamente, alcançando valores na ordem de 10^6 m. Isso implica que os efeitos de superfície dominam os efeitos de volume. Na microfluídica, a superfície está relacionada com as forças viscosas, eletrostáticas/eletrodinâmicas e a tensão superficial, enquanto o volume está relacionado às forças inerciais. Logo, para microdimensões, frequentemente, as forças inerciais podem ser negligenciadas. Para quantificar essa relação forças/interações, considere o projeto de um dispositivo microfisiológico para a mimetização de um microambiente celular específico: $L = 10^{-3}$ – 10^{-6} m; $v = 10^{-6}$ – 10^{-7} m/s; $\rho \approx 10^3$ kg/m³ e $\mu \approx 10^{-3}$ Pa.s. Assim, podemos calcular que $10^{-7} \leq Re \leq 10^{-3}$ (escoamento em regime de Stokes). Avaliando a Eq. (2.5) e constatando que o número de Reynolds é muito menor que 1 e que contribui com a parcela inercial da equação, a forma linearizada das equações de Navier-Stokes é aplicável para a descrição do problema. O sistema de equações resultantes é conhecido como equações de Stokes (Eq. 2.9). Matematicamente, as equações de Stokes demonstram que em microcanais as forças viscosas predominam no escoamento de um fluido:

$$\nabla \cdot \mathbf{v} = 0$$

$$\rho \left[\frac{\partial \mathbf{v}}{\partial t} \right] + \nabla P - \mu \nabla^2 \mathbf{v} = 0 \quad (2.9)$$

2.3.1.2 Equação de Brinkman

A equação que descreve a transição do campo de velocidades euleriano de um fluido entre um canal e um meio poroso é conhecida como equação de Brinkman, e é derivada de uma simplificação na equação de Navier-Stokes (Eq. 2.5) e de uma equação empírica

que descreve o escoamento através de um meio poroso homogêneo, conhecida como lei de Darcy (Darcy, 1856):

$$\mathbf{v} = -\frac{\kappa}{\mu}\nabla P \quad (2.10)$$

sendo κ [m²] a permeabilidade do meio poroso. Combinando as Eq. (2.9) e a lei de Darcy, deduz-se a equação de Brinkman, que descreve o escoamento de um fluido em um meio poroso influenciado pelos efeitos viscosos (Brinkman, 1947):

$$\mu\nabla^2\mathbf{v} - \frac{\mu}{\kappa}\mathbf{v} - \nabla P = 0 \quad (2.11)$$

A primeira contribuição, $\mu\nabla^2\mathbf{v}$, descreve o termo difusivo. A segunda, $\mu/\kappa \mathbf{v}$, descreve o termo de Darcy-Forchheimer, que caracteriza o escoamento em um meio poroso. A última contribuição, ∇P , descreve o gradiente da pressão intersticial.

Conforme obtido por meio da adimensionalização e rearranjo da equação de Navier-Stokes, existe um número de Reynolds específico para o escoamento em meios porosos, escrito como se segue:

$$\text{Re} = \frac{\rho v d_p}{\mu} \quad (2.12)$$

em que d_p é o comprimento característico típico de estruturas internas no meio poroso (Bear and Corapcioglu, 2012). A Eq. (2.13) também pode ser reescrita por meio do conceito físico da permeabilidade κ . Com unidade de comprimento ao quadrado, a raiz quadrada dessa grandeza pode ser vista como um comprimento característico (Eq. 2.8) ou um tamanho de poro característico (Eq. 2.13) (Guéguen et al., 1996). Sendo assim, o número de Reynolds para o meio poroso pode ser escrito como (Zhong et al., 2018; Bear, 2018):

$$\text{Re} = \frac{\rho v \sqrt{\kappa}}{\mu} \quad (2.13)$$

Para essa nova definição do número de Reynolds, existem quatro regimes para o escoamento em um meio poroso: 1) $\text{Re} < 1$, escoamento de Darcy ou escoamento rastejante; 2) $1 < \text{Re} < 10$, regime de escoamento inercial; 3) $150 < \text{Re} < 300$, regime de escoamento laminar; e 4) $\text{Re} > 300$, regime de escoamento turbulento (Bear, 2018).

2.3.2 Transporte de massa: equação de advecção-difusão

A equação que governa o transporte de massa em um volume de controle deriva da conservação de massa de espécies químicas. Essa equação é escrita em função da concentração de soluto, dada por c_α [mol/m³], em que o subscrito α representa um soluto genérico. A equação da continuidade é escrita como:

$$\frac{\partial (c_\alpha \rho)}{\partial t} = -\nabla \cdot \mathbf{J}_\alpha \quad (2.14)$$

em que ρ [kg/m³] é a densidade do soluto, e o fluxo \mathbf{J} é escrito como função do transporte de massa advectivo. Reformulando o fluxo da equação da continuidade, adicionando agora

um termo difusivo, conhecido como Lei de Fick:

$$\mathbf{J}_\alpha = \mathbf{J}_\alpha^{\text{advec}} + \mathbf{J}_\alpha^{\text{dif}} = c_\alpha \rho \mathbf{v} - D_\alpha \rho \nabla c_\alpha \quad (2.15)$$

sendo D_α [m^2/s] o coeficiente de difusão de uma espécie genérica em um meio fluido. Substituindo a Eq.(2.15) na Eq. (2.14), acrescentando um termo de influência externa para a concentração de uma espécie genérica (R_{c_α}) e rearranjando, tem-se que:

$$\frac{\partial c_\alpha}{\partial t} = D_\alpha \nabla^2 c_\alpha - \mathbf{v} \nabla c_\alpha + R_{c_\alpha} \quad (2.16)$$

Entendendo os termos envolvidos: (1) $\partial c_\alpha / \partial t$, descreve a variação temporal de concentração de uma espécie genérica α ; (2), $D_\alpha \nabla^2 c_\alpha$, descreve o termo de difusão de uma substância; (3), $\mathbf{v} \nabla c_\alpha$, descreve o termo advectivo de uma substância: a concentração em uma região pode variar de acordo com o escoamento; (4), R_{c_α} , descreve uma fonte ou sumidouro da concentração de uma espécie genérica α . A equação 2.16, que descreve um fenômeno onde quantidades físicas são transportadas dentro de um sistema físico, é conhecida como Equação de advecção-difusão ou Equação escalar de transporte (Bruus, 2008).

Sob a ótica do transporte de substâncias em microdispositivos, a adimensionalização da Eq. (2.16), tal qual feito para a equação de Navier-Stokes (Eq. (2.7)), também quantifica a influência dos microcanais nesse fenômeno físico. Considerando os seguintes adimensionais para a equação de advecção-difusão, $\mathbf{x} = (L) \bar{\mathbf{x}}$; $\mathbf{v} = (v) \bar{\mathbf{v}}$; $t = (L/v) \bar{t}$; $c_\alpha = (L^3/\text{mol}) \bar{c}_\alpha$; $\partial/\partial t = (v/L) \partial/\partial \bar{t}$; $\nabla = (1/L) \bar{\nabla}$, substituindo na Eq. (2.16), desconsiderando o termo de fonte/sumidouro, e rearranjando, têm-se que:

$$\text{Pe} \left[\frac{\partial \bar{c}_\alpha}{\partial \bar{t}} + \bar{\mathbf{v}} \bar{\nabla} \bar{c}_\alpha \right] = D_\alpha \bar{\nabla}^2 \bar{c}_\alpha \quad (2.17)$$

sendo Pe o número de Peclet (Pe). O número de Peclet é definido como a razão entre o transporte advectivo e o transporte difusivo que uma determinada espécie experimenta no escoamento de um fluido:

$$\text{Pe} = \frac{vL}{D} \quad (2.18)$$

Para os valores discutidos na Seção (2.3.1.1), e considerando uma difusão padrão para pequenas moléculas na ordem de $10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$, se calcula que $10^{-2} \leq \text{Pe} \leq 1$. Logo, como o número de Peclet contribui para a parcela advectiva na Eq. (2.17), em sistemas microfisiológicos para a mimetização de órgãos, o transporte de substâncias pode ocorrer majoritariamente pelo fenômeno de difusão, sendo o transporte por advecção dominante em situações bem específicas (Tabeling, 2005).

No contexto dos OoCs para a biomimetização da MO, no qual o transporte de massa ocorre através de uma matriz porosa tridimensional, a Eq. (2.16) precisa ser reescrita, de modo que:

$$\phi \frac{\partial c_\alpha}{\partial t} = D_\alpha^{\text{ef}} \nabla^2 c_\alpha - \mathbf{v} \nabla c_\alpha + R_{c_\alpha} \quad (2.19)$$

onde ϕ denota a porosidade, D_α^{ef} a difusividade efetiva no meio poroso e a velocidade é representada pela Lei de Darcy, $\mathbf{v} = (\kappa/\mu) \nabla P$.

2.3.3 Dinâmica celular

2.3.3.1 Equação de Contois

O crescimento de uma população celular em um microambiente genérico, considerando uma abordagem do contínuo para o sistema, é baseada na equação de transporte escalar, obtida por intermédio da aplicação da lei de conservação para uma espécie, especificamente a concentração celular $n = n(\mathbf{x}, t)$ [células/m³]. A equação que modela esse comportamento pode ser escrita como:

$$\frac{\partial n}{\partial t} = D_n \nabla^2 n - n \nabla \left(\frac{\partial \mathbf{u}}{\partial t} \right) + (R_{f,n} - R_{d,n}) n \quad (2.20)$$

em que D_n [m²/s] é o coeficiente de difusão celular isotrópica, $\mathbf{u}(\mathbf{x}, t)$ [m] é o vetor de deslocamentos dos pontos da MEC (Moreo et al., 2008), $R_{f,n}$ e $R_{d,n}$ são as taxas de crescimento e morte celular, respectivamente. A primeira contribuição, $\partial n / \partial t$, descreve a variação temporal de uma concentração celular específica. A segunda, $D_n \nabla^2 n$, descreve o termo de difusão isotrópica de um tipo particular de célula, como função da distribuição da concentração celular ao longo do domínio (Moreo et al., 2008). A terceira, $n \nabla (\partial \mathbf{u} / \partial t)$, descreve a contribuição do arrasto, como função dos deslocamentos da MEC e da concentração celular, causado pelo termo advectivo, à migração/expansão das células. O último termo da Eq. (2.20) se refere ao crescimento e morte celular. Este é descrito pela equação de Contois.

Em seu trabalho pioneiro, Contois (1959) descreveu uma relação inversamente proporcional entre a concentração e o crescimento de uma cultura microbiana, que ainda é regulada pela concentração de determinados solutos no meio. Expandindo esse modelo para o cenário de culturas de células (Coletti et al., 2006; Chung et al., 2006, 2007; Paim et al., 2019), deriva-se a seguinte equação:

$$R_{f,n} = R_{max} \frac{c_\alpha}{K_c n V_n \rho_n + c_\alpha} \quad (2.21)$$

sendo R_{max} [1/s] a taxa máxima de crescimento celular, K_c é o parâmetro de Contois, V_n [m³] é o volume de uma célula única e ρ_n [kg/m³] é a densidade de célula. Substituindo a Eq. (2.21) na Eq. (2.20), obtém-se a equação geral para o crescimento e distribuição celular:

$$\frac{\partial n}{\partial t} = D_n \nabla^2 n - n \nabla \left(\frac{\partial \mathbf{u}}{\partial t} \right) + \left(R_{max} \frac{c_\alpha}{K_c n V_n \rho_n + c_\alpha} - R_{d,n} \right) n \quad (2.22)$$

2.3.3.2 Modelo cinético de Michaelis-Mentem

Em um microambiente celular, a concentração dos solutos no meio é uma variável que depende da biologia das células, especificamente do seu metabolismo. Por outro lado, o metabolismo celular para a absorção desses solutos é função da concentração celular e da própria concentração dos solutos (Coletti et al., 2006; Buchwald, 2009). Baseado

no mecanismo de consumo de oxigênio mediado pelas enzimas, o modelo cinético de Michaelis-Mentem equaciona essas relações:

$$R_{\alpha} = R_{max,\alpha} \frac{c_{\alpha}}{c_{\alpha} + C_{MM,\alpha}} \cdot \delta(c_{\alpha} > C_{cr,\alpha}) \quad (2.23)$$

em que $R_{max,\alpha}$ [mol/s] é taxa máxima de consumo de um soluto α , $C_{MM,\alpha}$ [mol/m³] é a constante de Michaelis-Mentem que corresponde a uma concentração de soluto na qual o consumo é reduzido em 50% em relação ao máximo, $C_{cr,\alpha}$ [mol/m³] é a concentração crítica de um soluto que pode gerar morte celular após longa exposição e δ é a função de redução que exclui o consumo nas regiões celulares onde a concentração se encontra menor do que a crítica C_{cr} .

3 Materiais e Metodologia

Neste capítulo são apresentados os aspectos técnicos e biológicos do desenvolvimento do projeto do novo dispositivo IMNoC para a mimetização da MO. Especificamente, são descritos os protocolos utilizados para a sua microfabricação e as etapas experimentais para a caracterização, validação e avaliação do microambiente biomimetizado no IMNoC. Em especial é detalhada a criação *in vitro* do modelo da medula. Por fim, é apresentado o modelo computacional implementado para estudar o projeto e microambiente celular no microdispositivo por meio dos indicadores representados por variáveis de fenômenos de transporte e da dinâmica das células.

3.1 Propósito, projeto e fabricação do IMNoC

O desenvolvimento do microdispositivo IMNoC foi baseado em uma sequência de etapas que formam a concepção, projeto e validação da nova plataforma. Essas etapas foram divididas em 3 fases básicas e fundamentais para o estabelecimento de um racional no que diz respeito à biomimetização da MO *in vitro*.

A Fase 1 foi a pesquisa sobre Estado da Arte e as limitações que existem em alguns dos trabalhos mais relevantes para o estudo da MO em microdispositivos OoC. Para esse fim foi realizado um trabalho de revisão bibliográfica (sistemática) em quatro base de dados (Scopus, PubMed, Web of Science, e ScienceDirect), cobrindo os campos da engenharia, física, química e biologia, procurando por palavras chaves específicas (*e. g.* “bone marrow” AND (“organ on a chip” OR “microfluidic”)). Essa revisão focou nos seguintes aspectos: (1) aplicação dos dispositivos; (2) manufatura; (3) mecanismos fluídicos; (4) mimetização do microambiente da medula; (5) e principais melhorias e avanços em relação aos métodos convencionais. A Seção 2.2.3.1 detalha as informações obtidas nesta revisão.

A Fase 2 foi o estudo das premissas biológicas e físicas da MO normal e patogênica, guiada pela revisão da literatura sobre a sua estrutura, composição e função (Seção 2.1).

A Fase 3 foi a tradução desses princípios da MO em unidades funcionais projetáveis pelas ferramentas da bioengenharia. Essas unidades acopladas compuseram o projeto da geometria do microdispositivo considerando componentes chaves. O resultado foi o desenvolvimento de um sistema microfisiológico biomimético, por meio das ferramentas microfluídicas e de engenharia de tecido.

A plataforma OoC IMNoC planejada foi utilizada para avaliar a influência de um microambiente tridimensional que acopla propriedades mecânicas, físicas e biológicas da MO na representação da morfologia, viabilidade e proliferação das células leucêmicas da

LLA.

Os microdispositivos foram fabricados utilizando a manufatura aditiva e litografia suave. O molde mestre criado com o software de desenho guiado por computador SolidWorks 2011 (Dassault Systèmes SolidWorks Corp.) foi impresso utilizando uma impressora 3D, tecnologia SLA baseada em LCD (Photon Mono 4K, 3D Anycubic), de resina acrílica (Resina 3D Standard, 3D Lab). Após alguns experimentos foram avaliadas a qualidade da impressão, a estabilidade e integridade dos moldes. Na Tabela 3 são mostradas as configurações ótimas ajustadas.

Tabela 3 – Parâmetros para a impressão 3D em resina acrílica.

Parâmetros de fatiamento	
Espessura da camada	0,03 mm
Tempo normal de exposição	2 s
Tempo de folga	0 s
Tempo de exposição da camada inferior	12 s
Números de camadas inferiores	8
Distância de elevação (eixo Z)	7 mm
Velocidade de elevação (eixo Z)	4 mm/s
Velocidade de retração (eixo Z)	6 mm/s

Fonte: Autoral.

O molde foi lavado em banho de álcool isopropílico, 50 watts por 5 minutos em cuba ultrassônica, e depois foi pré-curado em luz UV (comprimento de onda de 405 nm), 72 watts por 2 horas. Para evitar a inibição da cura do elastômero pelos monômeros presentes na superfície do molde de resina, que também são citotóxicos às células, um tratamento térmico foi realizado em forno a 60 °C por 24 horas.

O elastômero PDMS e o agente de cura (Sylgard 184 kit, Dow Corning, MI, EUA) foram pesados em uma balança eletrônica de precisão (AD 1000, Marte), em uma razão de 10:1 em massa ($\rho_{\text{PDMS}} = 0,965 \text{ g/cm}^3$), misturados lenta e constantemente, por 10 minutos, até atingir a homogeneização adequada. Essa solução polimérica foi posteriormente desgaseificada em um dessecador de vidro, utilizando uma bomba a vácuo (WP6111560; Chemical Duty Pump 115 V/60, Milipore), a 7,25 psi por 30 minutos, sendo o vácuo aplicado de forma oscilatória pelo fechamento e abertura da válvula de pressão. A mistura foi derramada no molde mestre e curada em um forno a 60 °C por 4 horas. Após a cura, a estrutura de PDMS foi destacada do molde e as entradas/saídas do gel de colágeno e fluidos foram feitas utilizando punções de biópsia de 2 e 3 mm (Punção Dermatológico Estéril Descartável, Kolplast), respectivamente. Por fim, os microdispositivos foram lavados em álcool isopropílico e água destilada por 5 minutos cada, em banho ultrassônico (50 watts).

Para a montagem da plataforma OoC, as estruturas moldadas de PDMS foram

seladas a lamínulas de vidro, 24 x 50 mm e espessura 0,13–0,16 mm, utilizando o método convencional de plasma de oxigênio. Na montagem por esse método, as superfícies com os microcanais do PDMS e a da lamínula foram expostas ao plasma de oxigênio a 500 mTorr, 60 watts por 50 segundos em um forno a plasma (Reactive Ion Etching (RIE) PE-100, Plasma Etch Inc). Finalizando o tempo de exposição, o sistema foi ventilado por 15 minutos e as amostras foram retiradas da câmara. Imediatamente após a retirada, as amostras foram colocadas em contato cuidadosamente, permitindo assim a ligação.

A plataforma OoC foi esterilizada preenchendo os microcanais com etanol 70 %, subsequentemente água e levando ao forno a 60°C *overnight* para secar.

3.1.1 Cálculo da pressão de extravasamento

Para o projeto das portas de contenção, adaptou-se a abordagem descrita por Wang et al. (2016). Baseada na equação de Young-Laplace, a diferença de pressão na interface ar-gel para um gel avançando nos microcanais pode ser representada como se segue:

$$\Delta P1 = P_{gel} - P_{ar} = -2\gamma \left(\frac{\cos \theta_A}{l_{canal}} + \frac{\cos \theta_A}{h_{canal}} \right) \quad (3.1)$$

em que P_{gel} é a pressão de avanço do gel dentro do microcanal, γ é a tensão superficial ($\gamma = 0,072$ N/m), θ_A é o ângulo de contato crítico onde o líquido vai extravasar ($\theta_A = 140^\circ$), l_{canal} é a largura do canal e h_{canal} é a altura do canal (Wang et al., 2016). A pressão de extravasamento na interface ar-gel nas portas é representada da forma:

$$\Delta P2 = P_{gel-ext} - P_{ar} = -2\gamma \left(\frac{\cos \theta_A^*}{l_{porta}} + \frac{\cos \theta_A^*}{h_{porta}} \right) \quad (3.2)$$

sendo $P_{gel-ext}$ a pressão do gel na interface das portas, θ_A^* é o ângulo de contato do líquido com a face interna da parede lateral das portas (o valor máximo de θ_A^* é 180°, relativo ao ângulo de contato para o menisco de um líquido), l_{porta} é a largura da porta e h_{porta} é a altura da porta (Nelson et al., 2019).

3.1.2 Avaliação da geometria do IMNoC

Uma das etapas fundamentais no processo de manufatura é a avaliação dimensional/geométrica do produto gerado, a fim de identificar possíveis divergências em relação ao projeto inicial. Na microfabricação em microfluídica essas avaliações requerem ainda mais atenção por se tratar de estruturas em escalas micrométricas, nas quais pequenas variações interferem significativamente nos resultados esperados. Diferentemente da fotolitografia, método padrão e com processos bem estabelecidos, além de resoluções mínimas bem menores do que as requeridas na microfluídica (10–100 nm), a impressão 3D para a manufatura de moldes mestres é um método inovador que necessita de uma avaliação minuciosa das estruturas geradas. Por exemplo, considerando as especificações da impressora utilizada

nesta tese, as resoluções XY e no eixo Z são, respectivamente, 35 μm e 10 μm . Essas grandezas são próximas das menores dimensões de um microdispositivo, podendo a própria precisão do equipamento alterar significativamente as dimensões. Sendo assim, essas duas direções de impressão serão avaliadas nesta seção.

Para análise das estruturas nas coordenadas XY, a obtenção das imagens e a mediação das dimensões do microdispositivo foram realizadas com o auxílio de uma lupa eletrônica (Stemi 2000-C/Carl Zeiss) e do *software* específico (Axio Vision LE). Para cada estrutura quantificada (*e. g.* canais fluídicos, câmaras de cultura e portas de contenção) foram tomadas três medidas independentes em regiões diferentes de três dispositivos. Os resultados foram apresentados como a média \pm DP.

Para a análise da espessura no eixo Z, a obtenção das imagens e a mediação das dimensões do microdispositivo foram realizadas com o auxílio de um perfilômetro óptico (Zygo - ZYGO7300) e do *software* de visualização, análise e medição em perfilometria, baseado na internet, ProfilmOnline¹. A espessura foi quantificada nos canais, nas câmaras de cultura e entre as câmaras e as portas de contenção, sendo tomadas três medidas independentes em regiões diferentes de quatorze dispositivos. Os resultados foram apresentados como a média \pm DP.

3.1.3 Ensaio de citotoxicidade do PDMS moldado

Em um trabalho recente, Ferraz et al. (2020) estudaram a presença de componentes tóxicos no PDMS moldado pela litografia suave em moldes 3D impressos em resina. Esses componentes podem ser liberados pelas resina acrílicas, material para a impressão 3D que apresenta propriedades tóxicas. Em seu trabalho, os autores avaliaram que a utilização dos procedimentos de pós-cura reportados por Venzac et al. (2021) possibilitou a realização de uma cultura celular fisiológica no PDMS moldado.

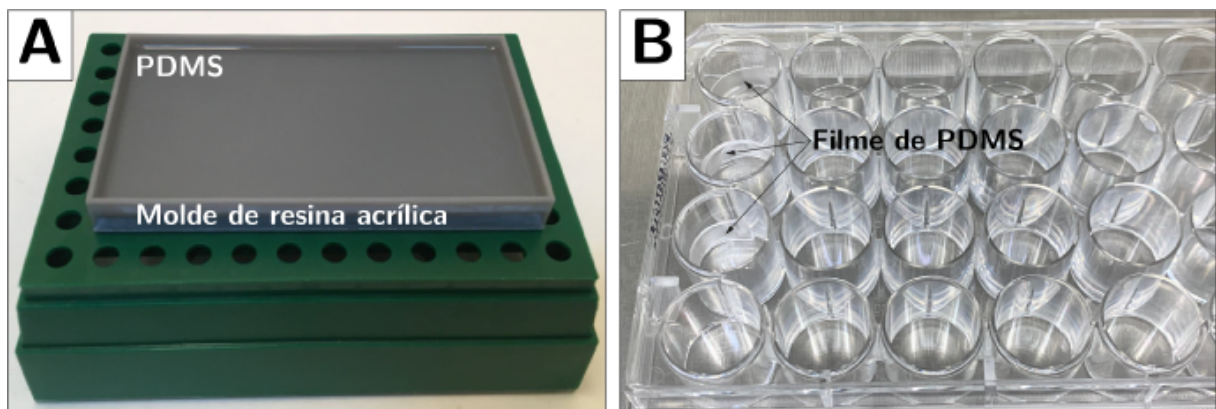
Nesse cenário, a citotoxicidade do PDMS curado no molde mestre de resina acrílica foi avaliada utilizando um ensaio em contato que mede a atividade metabólica das células, conhecido como ensaio de redução do MTT.

No ensaio, 1×10^4 células/poço do tipo cardiomiócitos de ratos H9c2 (0098; Banco de Células do Rio de Janeiro) foram semeados em uma placa de 24 poços em meio de cultura DMEM (D7777; High Glucose, Thermo Fischer), suplementado com 10 % de soro fetal bovino (FBS; Gibco), e na presença do PDMS moldado (Figura 21). O experimento foi elaborado com base na norma ISO 10993-5:2009(E) para testes de citotoxicidade *in vitro*. As células foram incubadas em uma atmosfera umidificada a 37 °C e 5 % CO₂, por 72 horas. O meio de cultura foi retirado e adicionou-se 500 μL de MTT diluído em proporção 1:10 em meio de cultura de crescimento. A placa foi incubada por 2 horas. O MTT foi

¹ <https://www.profilmonline.com>. Acesso em: 07 de junho de 2022

retirado e a cultura foi lavada uma vez com PBS 1X. Em uma capela de fluxo laminar, adicionou-se 1 mL de isopropanol-ácido na cultura para a diluição dos cristais de formazan. Utilizando uma placa de 96 poços, 100 μ L de isopropanol-ácido foi adicionado nos poços, e então adicionou-se 100 μ L de cada amostra da cultura celular tratada com MTT. Os experimentos foram realizados em triplicata, sendo os dados obtidos para o tempo de 24 e 72 horas. Utilizando o software GraphPad Prism, os resultados foram apresentados como a média \pm DP e as diferenças foram consideradas significativas em $p > 0,05$ para o test t independente. A absorvância foi detectada no leitor de placas ELISA a 595 nm.

Figura 21 – Preparo das amostras de PDMS para o teste MTT: (A) Molde de resina e cura do PDMS. (B) Montagem das amostras na placa de 96 poços.



Fonte: Autoral.

3.2 Caracterização da matriz de colágeno

3.2.1 Preparação do gel de colágeno

Para os modelos 3D, foi preparada uma solução de colágeno tipo I 4 mg/mL de acordo com a proporção em volume final da solução: (1) 10 % PBS 10X; (2) 1,75 % 1N NaOH; (3) 74 % de colágeno tipo I 5,4 mg/mL; e (4) 14,25 % de meio de cultura RPMI 1640 incompleto. O colágeno tipo I foi gentilmente cedido pelo Professor Gregory Thomas Kitten do Departamento de Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, extraído conforme protocolo reportado na literatura (Kitten et al., 1982, 1996). Antes de se iniciar a preparação, os reagentes foram colocados em gelo para que se evite uma polimerização precoce do gel de colágeno. Em um Eppendorf de 1,5 mL pré-resfriado e estéril, foram misturados na seguinte ordem o PBS 10X, 1N NaOH e colágeno tipo I, mantendo a mistura no banho de gelo. Rapidamente, com o auxílio de uma pipeta, a solução de meio de cultura foi pipetada lentamente dentro do Eppendorf contendo os outros reagentes, e homogeneizado suavemente com movimentos “*up and down*”, até garantir a mistura

ideal dos reagentes na solução. Para garantir uma homogeneização adequada da solução foi necessário realizar o processo “*up and down*” diversas vezes. Após a homogeneização completa e cuidadosa dos componentes, foi realizada a verificação do pH ideal para a cultura celular (7,0 – 7,5), sendo a solução caracterizada por uma coloração rosa clara.

3.2.2 Microscópio eletrônico de varredura

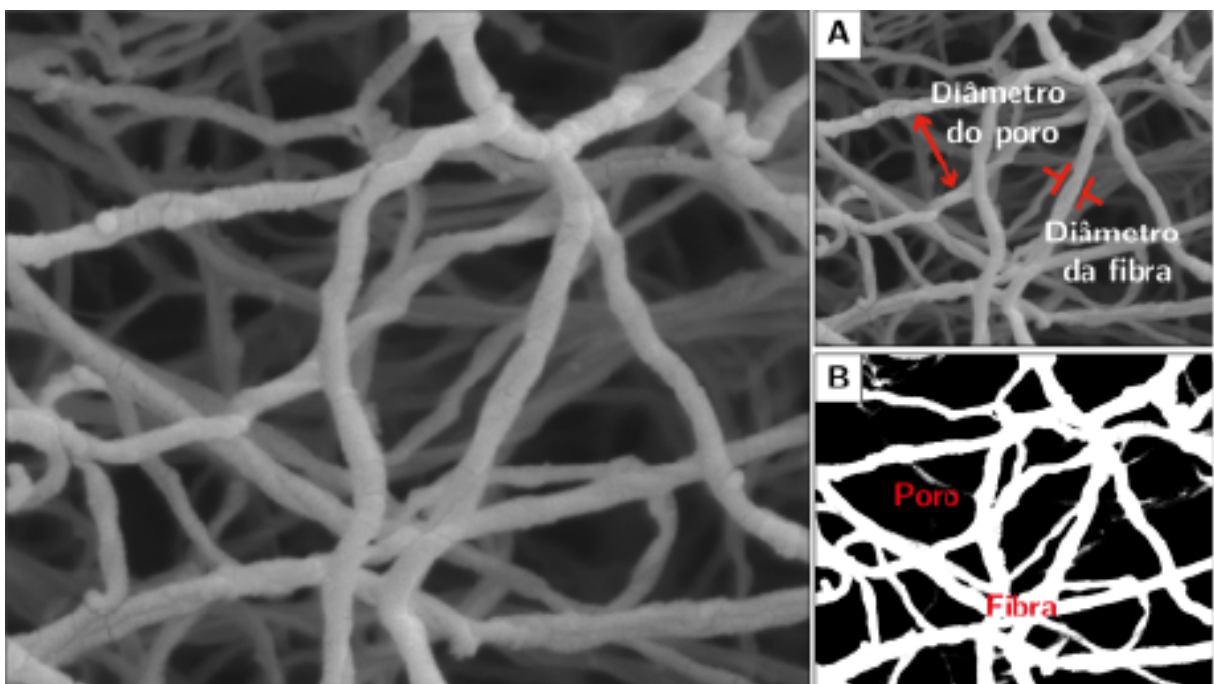
Seguindo o protocolo de preparo do colágeno (ver Seção 3.2.1), 1 mL de solução de colágeno em meio RPMI 1640 completo foi depositado em uma placa de Petri (diâmetro de 35 mm), gerando uma estrutura tridimensional com 1 mm de espessura. A placa foi incubada por 15 minutos a 37 °C e 5 % CO₂ para uma gelificação inicial do gel de colágeno. Posteriormente adicionou-se 500 µL de RPMI 1640 completo na superfície do gel, incubando a placa por 5 horas (37 °C, 5 % CO₂, umidade > 95 %), tempo suficiente para garantir a polimerização completa. Após a polimerização, o colágeno foi transferido da incubadora para a capela de fluxo e todo o meio de cultura foi removido rapidamente. O gel foi lavado 1X com 500 µL de meio de cultura sem soro ou antibióticos com redemoinhos suaves por 1-2 minutos para remover os resíduos flutuantes. O meio foi removido e adicionou-se 300 µL de fixador de Karnovsky (Karnovsky modificado em tampão cacodilato 0,1M; Centro de Microscopia, UFMG) a 37 °C até cobrir a superfície do gel, e então foram realizados movimentos circulares por 1 minuto. O fixador foi removido e adicionou-se 700 µL do fixador de Karnovsky, sendo o gel incubado em um agitador rotativo por 1 hora. Após a agitação, retirou-se o fixador do gel e, utilizando um tampão de cacodilato 0,1M (Centro de Microscopia, UFMG) foram realizadas duas lavagens, com 700 µL, em um agitador rotativo por 5 minutos cada. Todo o tampão foi retirado ao final dessa etapa.

Após as lavagens, considerando 25 mm a partir do centro da placa, foram cortadas 6–8 amostras cúbicas com dimensões (2–3) mm x (2–3) mm x 1 mm. Retirar amostras do centro do gel é justificado porque a estrutura do gel é mais homogênea, diferentemente do que ocorre nas bordas, onde os meniscos formados em contato com o recipiente podem modificar a estrutura do colágeno. Por fim, as amostras coletadas foram pós-fixadas em 1% de ósmio, por 1–2 horas, lavadas em água, desidratadas por meio de uma série graduada de soluções alcólicas (álcool 35 %, 50 %, 70 %, 85 %, 95 % e 100 %), secas em ponto crítico de CO₂ (Leica EM CPD 030) e revestidas com ouro/paládio (Sputter Coater MED 020, Baltec). Para visualizar as amostras utilizou-se um microscópio eletrônico de varredura (MEV) FEI Quanta 200 FEG, com uma tensão de feixe de 10 kV e uma ampliação de 0,7–120 kX.

3.2.3 Análise microestrutural

Os métodos de análise da microestrutura foram baseados no trabalho de Raub et al. (2008). A caracterização das propriedades microestruturais da matriz tridimensional de colágeno foi realizada utilizando imagens adquiridas pelo MEV, como descrito anteriormente. A quantificação da microestrutura foi realizada por meio do software livre de visualização e processamento de imagem ImageJ, e suas ferramentas especiais de medição (Figura 22).

Figura 22 – Imagem representativa do hidrogel de colágeno no MEV e das propostas de quantificação da microestrutura. (A) Anotações indicando os parâmetros de diâmetro do poro e da fibra. (B) *Thresholding*–Binarização de uma imagem gerada pelo MEV.



Fonte: Autoral.

Para o cálculo do diâmetro das fibras do gel de colágeno a ferramenta de desenho de linhas foi utilizada, sendo as medidas realizadas em uma posição identificável da fibra. Para o cálculo do diâmetro dos poros foi aplicado um *threshold* nas imagens, sendo analisadas posteriormente com uma ferramenta chamada “Analisar Partículas”, onde os poros são identificados como partículas e quantificados pelo software. Para o cálculo da porosidade do gel as imagens foram binarizadas e a razão entre área dos poros (preto) e das fibras (branco) foi calculada e avaliada para os conjuntos gerados. Esses parâmetros foram examinados para cada hidrogel de colágeno, sendo os dados apresentados como a média dos valores \pm DP.

3.3 Primeiro modelo celular no IMNoC: estudos preliminares

Um ensaio piloto foi dirigido para se avaliar a estabilidade da cultura, homogeneidade e a integração entre os nichos como função da geometria projetada para o IMNoC. Além disso, de fundamental importância, se avaliou a viabilidade e morfologia das células em um microambiente padrão de cultura *in vitro* tridimensional (Antoine et al., 2014). Para isso, uma monocultura das células leucêmicas Jy foi realizada de modo estático na plataforma IMNoC em uma MEC formada por um hidrogel de colágeno tipo I de cauda de rato em concentração 2 mg/mL, a uma concentração de células de 1×10^6 células/mL, e para um tempo de 24 horas. Para esse experimento, tal colágeno foi selecionado por se tratar de um hidrogel amplamente utilizado em microdispositivos para a biomimetização de órgãos e tecidos humanos, com resultados para uma miríade de comportamento e respostas celulares. Nesse cenário, esse hidrogel pode ser utilizado como padrão para avaliar as células nesse primeiro modelo. Toda a cultura foi realizada em uma capela de fluxo laminar, ambiente estéril e com materiais estéreis.

3.3.1 Cultura celular

A linhagem de células humanas Jy, linhagem linfoblastóide de células humanas B imortalizadas pelo vírus Epstein-Barr (EBV), modelo representativo da célula B precursora da LLA, foi comprada da Sigma-Aldrich (9287, 94022533). A manutenção e expansão da cultura foi realizada em meio RPMI 1640 completo (23400-021, Gibco), especificamente suplementado com 25 mM de HEPES (Gibco), L-glutamine (35050-061, Gibco), 10 % de SFB (12657029; Gibco) e 1,5 % de penicilina/estreptomicina (P4333, Sigma-Aldrich).

3.3.2 Preparação da matriz tridimensional

Para os modelos 3D, as células foram cultivadas em uma solução de colágeno tipo I de cauda de rato 2 mg/mL de acordo com a proporção em volume final da solução: (1) 10 % PBS 10X; (2) 1,8 % 1N NaOH; (3) 66,6 % de colágeno tipo I 3 mg/mL (Thermo Fischer, A10483-01); e (4) 21,6 % de suspensão celular em meio de cultura. Antes de se iniciar a preparação, os reagentes foram colocados em gelo para que se evite uma polimerização precoce do gel de colágeno. Em um Eppendorf de 500 μ L pré-resfriado e estéril, foram misturados na seguinte ordem o PBS 10X, 1N NaOH e colágeno tipo I, mantendo a mistura no banho de gelo. Rapidamente, com o auxílio de uma pipeta P20 2-20 μ L, a solução de meio de cultura e células foi pipetada lentamente dentro do Eppendorf contendo os outros reagentes, e homogeneizada suavemente com movimentos “*up and down*”, feito diversas vezes, até que se garante a mistura ideal da solução. Após a homogeneização completa e cuidadosa dos componentes, foi realizada a verificação do pH ideal para a cultura celular (7,0 – 7,5), sendo a solução caracterizada por uma coloração rosa clara.

3.3.3 Cultura das células e injeção de colágeno

Uma solução de colágeno e células foi injetada nas câmaras de cultura com o auxílio de uma micropipeta P20 2-20 μL , em um volume de 10 μL . Nas entradas e saídas de colágeno, foi depositado um volume de 20 μL de meio RPMI 1640 completo com 10 % de soro fetal bovino, para garantir a manutenção da umidade do hidrogel. A cultura 3D foi colocada em uma câmara úmida (umidade > 95 %) e incubada a 37 °C e 5 % CO_2 por 1 hora. Após esta etapa, utilizando uma micropipeta P20, os dois canais adjacentes às câmaras de cultura foram preenchidos com meio RPMI 1640 completo, e lavados à incubadora por 24 horas.

3.3.4 Análise qualitativa da cultura celular

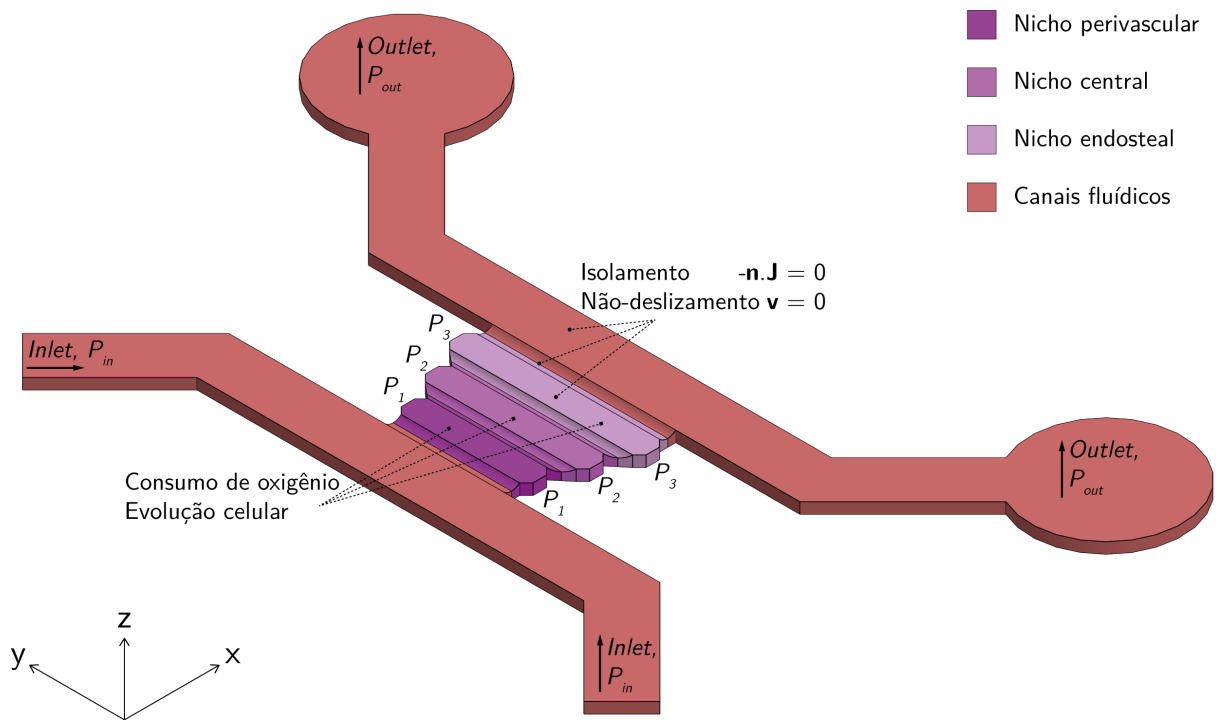
A viabilidade, morfologia e distribuição das células Jy inseridas em um microambiente tridimensional estático foram avaliadas se utilizando o composto fluorescente metabolizável calceína AM (CaAM) (C1359; Invitrogen), na condição de trabalho CaAM 2 μM por 2 horas. A marcação foi realizada após 24 horas de cultura, em que 10 μL de solução de CaAM 2 μM foram adicionados em cada entrada de injeção de colágeno, totalizando 60 μL . A lavagem foi realizada com o mesmo volume de CaAM, nesta etapa utilizando o meio RPMI 1640 completo com 10 % de soro fetal bovino. As imagens foram registradas utilizando um microscópio confocal de fluorescência (Nikon – C2+) e os resultados gerados pelo software NIS-Elements (RRID:SCR_014329).

3.4 Modelo computacional

Um sistema não-linear acoplando diferentes aspectos de natureza física foi modelado computacionalmente com base no método dos elementos finitos. Essa simulação multifísica foi desenvolvida para prever no microdispositivo IMNoC as variáveis de fenômenos de transporte, especificamente o mapa de velocidades e o perfil médio das velocidades e a concentração de oxigênio também como função da densidade celular. A geometria tridimensional dos volumes de controle projetada e modelada pelo software de desenho guiado por computador SolidWorks 2011 (Dassault Systèmes SolidWorks Corp.) foi exportada como arquivo .step e depois importada para o software comercial de elementos finitos Comsol Multiphysics (Comsol v5.6), resolvendo-se as equações discretizadas utilizando uma máquina Linux com 256 Gb de memória RAM. A simulação foi realizada em regime transiente para 3 dias (259.200 segundos) de experimento em cultura dinâmica, com um passo de tempo de 1.800 segundos (Coletti et al., 2006). A malha de elementos finitos foi definida após a análise de convergência, especificamente uma malha gerada como *Extrafine* (*Physics-controlled mesh*) composta por 3.200.622 elementos tetraédricos, com tamanho máximo e mínimo de 37,6 μm e 2,45 μm , respectivamente. Toda a simulação foi

realizada em um volume de controle simplificado visando uma menor demanda de recurso computacional, e, conseqüentemente, tempo de simulação reduzido. Essas simplificações foram aplicadas em estruturas irrelevantes para a simulação, adaptando-se, sempre que necessário, as condições de contorno relativas às variáveis do problema. Na Figura 23, são apresentadas a geometria do volume de controle e as condições de contorno do modelo computacional da geometria simplificada.

Figura 23 – Representação computacional do volume de controle e das condições de contorno no modelo simplificado.



Fonte: Autoral.

Fluidodinâmica. O modelo fluidodinâmico foi implementado considerando o meio de cultura como um fluido newtoniano incompressível escoando ao longo dos microcanais livres e do meio poroso, sendo assim modelado utilizando as equações de continuidade (Eq. 2.3) e de conservação de quantidade de movimento (Eq. 2.4), negligenciando a contribuição inercial, compondo as Equações de Stokes, e a equação de Brinkman (Eq. 2.11):

$$(i) \nabla \cdot \mathbf{v} = 0$$

$$(ii) \rho \left[\frac{\partial \mathbf{v}}{\partial t} \right] + \nabla P - \mu \nabla^2 \mathbf{v} = 0$$

$$(iii) \mu \nabla^2 \mathbf{v} - \frac{\mu}{\kappa} \mathbf{v} - \nabla P = 0$$

Para as equações fluidodinâmicas, o escoamento do fluido intersticial foi considerado ser induzido por um gradiente de pressão ΔP , gerado por reservatórios com alturas de líquidos específicas, da esquerda (*Inlet*, $P_{in} = 290$ Pa, 29 mmH₂O) para a direita (*Outlet*, $P_{out} = 0$ Pa, 0 mmH₂O) de 290 Pa. As pressões nas entradas/saídas da câmara de gel de colágeno foram consideradas como 195 Pa, 93 Pa e 25,5 Pa, respectivamente P_1 , P_2 e P_3 . Esses valores foram obtidos com a solução das Equações de Stokes para o modelo computacional de geometria completa. Uma condição de não-deslizamento ($\mathbf{v} = 0$) foi aplicada às superfícies internas do microdispositivo.

Considerando um meio de cultura a 37°C, a densidade ρ foi considerada como 1000 kg/m³ e a viscosidade dinâmica μ como 8,1 x 10⁻⁴ N.s/m² (Marturano-Kruik et al., 2018). O meio poroso foi representado por uma matriz de hidrogel de colágeno tipo I 4 mg/mL. Essa matriz de hidrogel foi assim escolhida por apresentar um módulo de elasticidade similar ao que as células experimentam em um nicho específico da medula óssea, o nicho central, especificamente com valor de 1200 Pa (Bruce et al., 2015). Sendo assim, a simulação será realizada em um domínio com propriedades mecânicas relevantes para o estudo do comportamento das células na MO, além das propriedades hidráulicas explicitadas na sequência. A permeabilidade κ dessa matriz foi estimada em 1,78 x 10⁻¹⁴ m² (Lee et al., 2022), enquanto a porosidade ϕ em 0,4963 (1 - fração sólida), conforme experimento apresentado na Seção 3.2.

Transporte de massa. O modelo de transporte de massa foi implementado considerando o oxigênio como uma espécie diluída em um meio de cultura que escoar por canais livres, por um meio poroso tridimensional e é consumido por uma população celular, sendo assim modelado por meio das equações de advecção-difusão (Eq. 2.16), advecção-difusão corrigida para a porosidade (Eq. 2.19) e pelo termo de taxa de reação da cinética de Michaelis-Menten:

$$(i) \frac{\partial c_{O_2}}{\partial t} = D_{O_2} \nabla^2 c_{O_2} - \mathbf{v} \cdot \nabla c_{O_2} + R_{O_2}$$

$$(ii) \phi \frac{\partial c_{O_2}}{\partial t} = D_{O_2}^{ef} \nabla^2 c_{O_2} - \mathbf{v} \cdot \nabla c_{O_2} + R_{O_2}$$

$$(iii) R_{O_2} = R_{max,O_2} \frac{c_{O_2}}{c_{O_2} + C_{MM,O_2}} n \cdot \delta(c_{O_2} > C_{cr,O_2})$$

Para as equações de transporte de massa, uma concentração inicial $c_{O_2}(\mathbf{x}, 0) = 0,186$ mol/m³ de oxigênio foi assumida para toda o sistema. Essa concentração foi calculada por meio de uma equação que estima a porcentagem de oxigênio como função da porcentagem de

outros gases que estejam na atmosfera daquele ambiente:

$$\%O_{2(final)} = \left(\%O_{2(inicial)} \times \left(1 - \%gás_{(1)} - \%gás_{(n\dots)} \right) \right) \times 100 \quad (3.3)$$

Em uma incubadora de cultura de células a 37°C e umidade maior que 95%, a porcentagem de vapor de água na atmosfera é igual a 6,2%. Considerando a presença de 5% de CO₂, obtém-se a concentração final de oxigênio no meio de cultura aplicando essas porcentagens na Eq. 3.4 $[(0,21 \times (1 - 0,062 - 0,05) \times 100) = \mathbf{18,6\%}]$ (Place et al., 2017). A concentração de oxigênio c_{O_2} na entrada (*Inlet*) foi considerada constante e igual a 0,21 mol/m³ (as seringas com os meios de cultura não ficam na incubadora), com um condição de fluxo convectivo imposta nas entradas (*Inlet*) e saídas (*Outlet*). Uma condição de paredes impermeáveis foi considerada ($-\mathbf{n} \cdot \mathbf{J} = 0$, sendo \mathbf{n} o vetor normal à superfície e \mathbf{J} o vetor de fluxo), impondo uma condição de contorno de isolamento (Marturano-Kruik et al., 2018).

Considerando o oxigênio dissolvido em meio de cultura, a difusividade D_{O_2} foi dada como $3,29 \times 10^{-9}$ m²/s (Marturano-Kruik et al., 2018). A difusividade efetiva $D_{O_2}^{ef}$ foi calculada diretamente dentro do Comsol Multiphysics como função das propriedades hidráulicas do meio poroso (permeabilidade e porosidade). A taxa máxima de consumo de oxigênio R_{max,O_2} para as células Jy foi de $1,2 \times 10^{-17}$ mol/células.s, aproximação que considera o consumo das células Jurkat (Wagner et al., 2011). As células Jurkat são linhagens humanas imortalizadas de linfócitos T, usadas para estudar a leucemia linfóide T, o que justifica uma primeira aproximação para o comportamento das células Jy. A constante de Michaelis-Mentem C_{MM,O_2} foi considerada como 1×10^{-3} mol/m³ (1 μM), equivalente a $P_{MM,O_2} = 0,7$ mmHg, correspondente aos valores biológicos e experimentais reportados na literatura (Buchwald, 2009). A função de redução δ foi implementada no Comsol Multiphysics como uma função suave de Heaviside (*smoothed Heaviside function*), com primeira derivada contínua e sem *overshoot* (flc1hs), de modo que $\delta(c_{O_2}) = \text{flc1hs}(c_{O_2} - C_{cr,O_2}, C_{cr,O_2}/2)$, permitindo considerar a necrose e incorporar a interrupção do consumo de oxigênio quando a concentração crítica $C_{cr,O_2} = 1 \times 10^{-4}$ mol/m³ (0,1 μM) for alcançada (Buchwald, 2009). Essa concentração corresponde a $P_{cr,O_2} = 0,07$ mmHg, tensão de oxigênio responsável por induzir a apoptose em células normais e tumorais (Papandreou et al., 2005).

Dinâmica celular. O modelo de dinâmica celular foi implementado considerando a distribuição de células em um microambiente tridimensional como função da concentração de oxigênio, sendo assim modelado pela equação de Contois para o crescimento celular (Eq. 2.22), corrigida para considerar a falta de oxigênio e negligenciando os termos de difusão e transporte advectivo. A morte celular foi implementada por um termo que é o produto entre a taxa de crescimento e a razão entre a população celular atual e a máxima concentração do domínio. Esse modelo é conhecido também como modelo logístico para o

crescimento populacional. A equação de dinâmica populacional é escrita como se segue:

$$(i) \frac{\partial n}{\partial t} = \left(R_{max} \frac{c_{O_2}}{K_c n V_n \rho_n + c_{O_2}} \right) \left(1 - \frac{n}{N} \right) n \cdot \delta(c_{O_2} > C_{cr, O_2})$$

em que N é a máxima concentração celular que o domínio suporta.

Para a equação da dinâmica celular, a linhagem de células Jy, linhagem linfoblastóide de células humanas B imortalizadas pelo vírus Epstein-Barr (EBV), modelo representativo da célula B precursora da LLA, foi utilizada. A concentração celular n foi de 1×10^6 células/mL e assumiu-se uma distribuição homogênea por toda a cultura tridimensional. Considerando o volume V_n da célula Jy como $2,43 \times 10^{-16}$ m³, reportado para o volume de células da LLA (Chapman et al., 1981), e a fração sólida calculada da matriz de colágeno (0,5037), a concentração máxima N foi estimada em $2,07 \times 10^9$ células/mL. Uma condição de fluxo celular nulo foi imposta nas interfaces entre o meio poroso e o canal de escoamento livre.

Experimentalmente, levando em conta a cultura de células tumorais não aderentes, a taxa máxima de crescimento R_{max} foi estimada em 1/dia, equivalente a um tempo de dobra de 24 horas, por intermédio da realização de uma curva de crescimento em cultura em suspensão. Esse valor é corroborado nos estudos sobre células linfoblastóides de linhagem (Sie et al., 2009). O parâmetro de Contois K_c foi definido como 0,006 mol/células.kg (Coletti et al., 2006). A densidade ρ_n das células Jy foi considerada como sendo 1.075 kg/m³, como reportado para os leucócitos em situações normais e em pacientes com LLA (Zipursky et al., 1976).

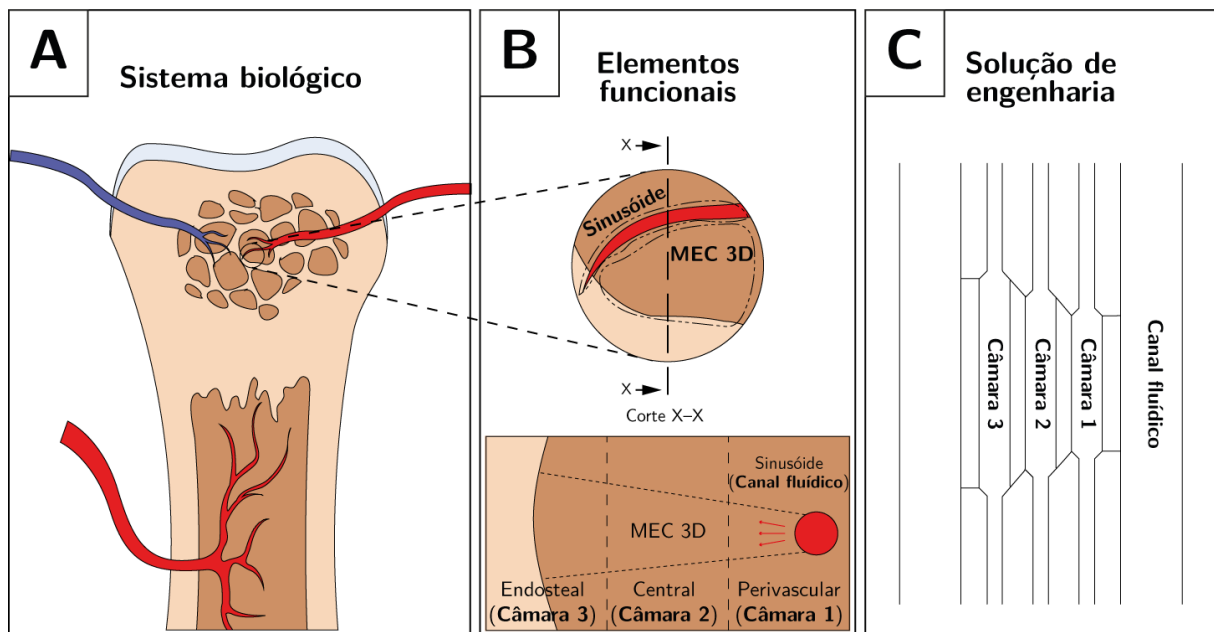
4 Resultados e Discussões

Neste capítulo são apresentados e discutidos os resultados com a aplicação dos protocolos detalhados na seção de Materiais e Metodologia.

4.1 Dispositivo IMNoC do tipo OoC para a mimetização da MO

O projeto do microdispositivo IMNoC foi inspirado nos princípios biológicos da MO e nas plataformas OoC desenvolvidas para o estudo desse órgão, conforme descrito ao longo da Seção 2. No campo da bioengenharia, sistemas biológicos precisam ser entendidos como um conjunto de elementos funcionais reproduzíveis por meio de soluções de engenharia para a construção de modelos conceituais. Na Figura 24, é apresentado esse conceito.

Figura 24 – Esquema das etapas para a construção de um modelo conceitual baseado em um sistema biológico complexo: (A) Sistema biológico. (B) Elementos funcionais. (C) Solução de engenharia.



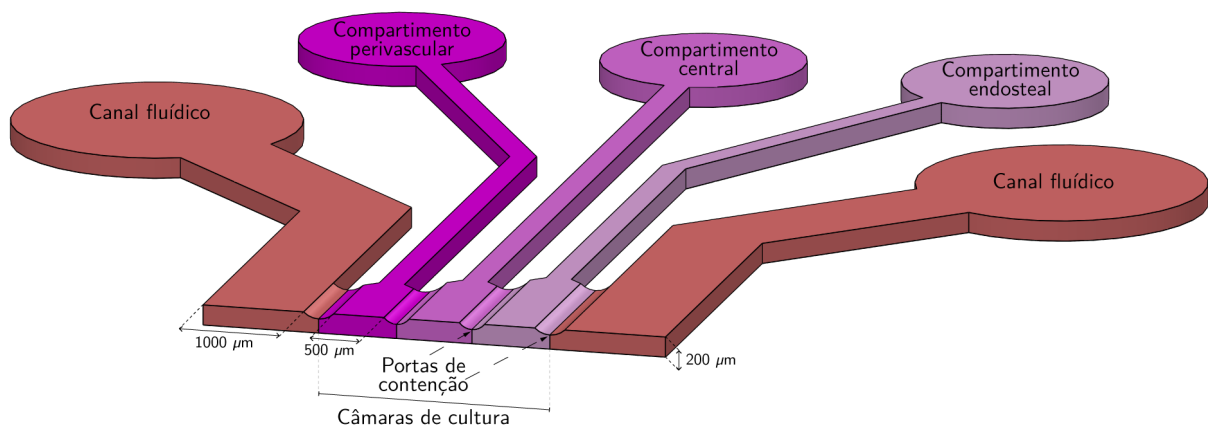
Fonte: Autoral. As peças de artes utilizadas nessa figura foram fornecidas pela *Servier Medical Art* (<http://smart.servier.com>). *Servier Medical Art* pela *Servier* é licenciada sob uma licença *Creative Commons Attribution 3.0 Unported*.

No contexto da MO, o sistema biológico estudado foi o microambiente da MO, formado basicamente pelo osso trabecular com a sua vascularização e as cavidades medulares (Figura 24A). Neste sistema, dois elementos funcionais fundamentais foram determinados: um vaso sinusoidal e uma MEC tridimensional que incluiu a medula e o endósteo (Figura 24B). Esta nova representação apresenta características que podem ser resumidas

em cinco premissas relativas ao funcionamento destes dois elementos fundamentais: (1) identificação de três nichos específicos (perivascular, central e endosteal); (2) nichos com diferentes composições celulares e propriedades mecânicas, físicas e químicas; (3) nichos geometricamente contínuos; (4) confinamento celular em uma matriz tridimensional; (5) fluido intersticial escoando pela matriz; e (6) gradiente de oxigênio ao longo dos nichos, com maior concentração no nicho perivascular e menor no nicho endosteal. Dessa forma, a identificação destas características e da arquitetura dos elementos funcionais dão origem a um microssistema base para o projeto do IMNoC. Na Figura 24B, é apresentada a MEC 3D dividida entre os nichos, representados por compartimentos homônimos, e a disposição e o sentido e direção da atuação do escoamento (setas vermelhas) oriundo do sinusóide no microambiente. Esta criação forneceu então ferramentas para a tradução do sistema em unidades básicas de engenharia, como mostrado na Figura 24C, e posterior desenvolvimento do modelo conceitual da IMNoC.

De acordo com o modelo conceitual apresentado na Figura 25, o IMNoC foi composto por unidades básicas que representam regiões específicas para a cultura celular: um compartimento de cultura mais próxima da entrada de fluido, mimetizando o nicho perivascular (Câmara 1); um compartimento de cultura intermediária, mimetizando o nicho central (Câmara 2); e um compartimento mais próximo da saída do fluido, mimetizando o nicho endosteal (Câmara 3). Essa foi a primeira particularidade da biologia da MO incorporada ao IMNoC.

Figura 25 – Vista de seção do modelo conceitual do IMNoC.

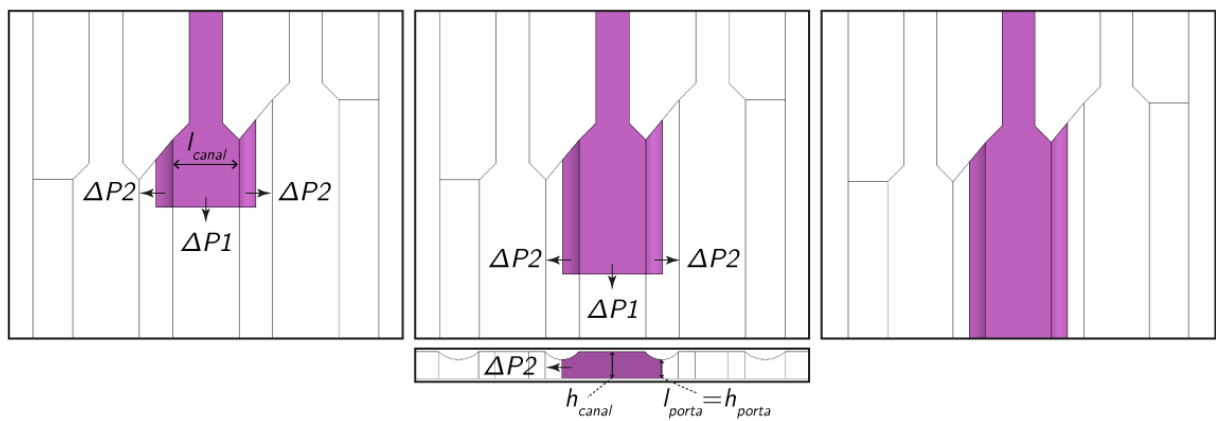


Fonte: Autoral.

Estas câmaras foram projetadas para comportarem uma cultura celular 3D em uma matriz porosa de hidrogel, como por exemplo o gel de colágeno, especificamente o tipo I, descrito anteriormente como o mais utilizado para a produção de microambiente tridimensionais genéricos (Antoine et al., 2014) e para a biomimetização da MO (Rosalem et al., 2020). Estas câmaras foram dimensionadas considerando um escoamento

circunferencial e buscando representar as reais dimensões dos nichos (aprox. 100–300 μm). Entretanto, devido as limitações da técnica de microfabricação baseada em impressão 3D, o tamanho mínimo do nicho foi dimensionado com 500 μm de largura. As câmaras foram conectadas com portas projetadas para impedir o extravasamento do gel, mas criando um microambiente fisicamente contínuo entre as três câmaras, permitindo a migração celular como resposta aos sinais extracelulares. Como já reportado na Seção 3.1.1, o projeto das portas de contenção foi baseado em uma equação que relaciona a geometria das estruturas com as pressões de extravasamento nos microcanais. Na Figura 26, está esquematizado o funcionamento das portas.

Figura 26 – Esquema ilustrativo da relação entre a equação de Young-Laplace e a contenção/preenchimento por gel nas câmaras microfluídicas.



Fonte: Autoral.

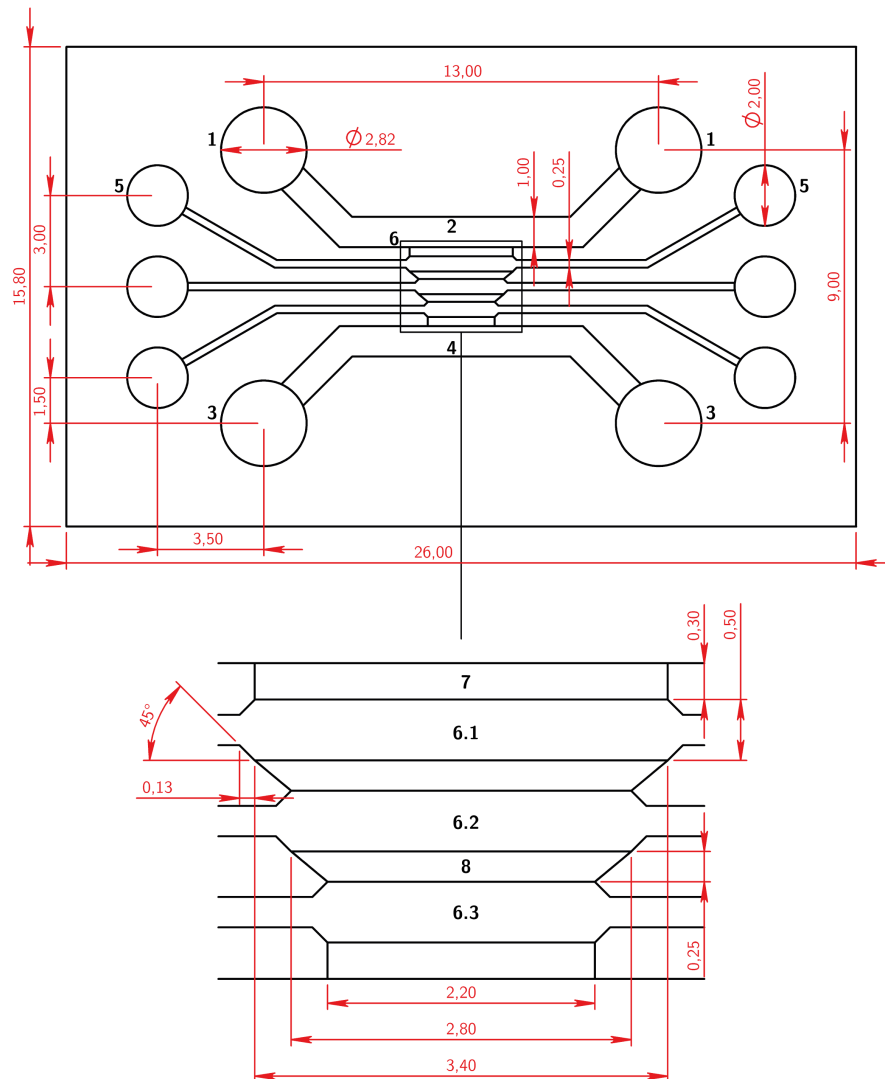
No processo de escoamento de fluido nas câmaras de cultura, duas pressões atuam sobre as frentes de avanço do fluido: $\Delta P1$ (Eq. 3.1), pressão de avanço relativa ao preenchimento da câmara principal, e $\Delta P2$ (Eq. 3.2), pressão de extravasamento relativa ao preenchimento de gel em uma câmara adjacente. Fisicamente, essas pressões podem ser entendidas como a resistência imposta ao gel quando escoar em determinado sentido. Naturalmente, o caminho preferencial do escoamento é no sentido das regiões de menor resistência, conseqüentemente menor pressão. Analisando o projeto, para as portas de contenção desempenharem com eficiência a sua função, é imperativo que a inequação $\Delta P2 - \Delta P1 > 0$ seja satisfeita. Considerando os parâmetros físicos apresentados na Seção 3.1.1 e os geométricos $l_{canal} = 500 \mu\text{m}$, $h_{canal} = 200 \mu\text{m}$ e $l_{porta} = h_{porta} = 140 \mu\text{m}$, temos que a pressão de avanço ($\Delta P1$) e de extravasamento ($\Delta P2$) são 772 Pa (78 mmH₂O) e 2.132 Pa (217 mmH₂O), respectivamente. A diferença entre as pressões é de 1.360 Pa (139 mmH₂O), permitindo um preenchimento apenas no sentido da câmara principal.

Baseado nos capilares presentes no microambiente medular (Seção 2.1), aqui representados pelos sinusóides, dois microcanais fluídicos foram projetados para serem fonte e

sumidouro do fluido intersticial, sendo responsáveis pelo fornecimento/retirada fisiológica de substâncias, além de ativar os mecanismos de mecanotransdução celular.

Fundamentado no exposto acima, nas figuras 27 e 28, é apresentado o projeto do IMNoC. Na Figura 27, é apresentada a geometria e dimensões pela vista superior. Os valores para a largura e altura do canal foram dimensionados respeitando a razão de aspecto ideal para evitar o decaimento e emparelhamento dos canais após a microfabricação em PDMS ($0,2 \geq h/d \geq 0,56$). As entradas/saídas dos canais fluidicos foram ajustadas de modo a permitirem a conexão de periféricos para geração de escoamento.

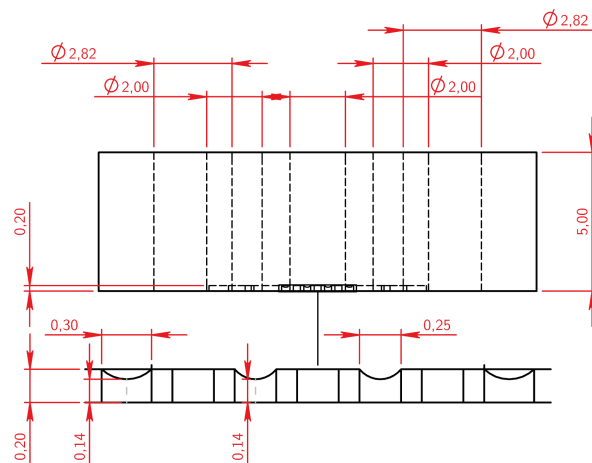
Figura 27 – Vista superior do projeto do microdispositivo IMNoC: 1) Entrada do canal fluídico. 2) Canal fluídico de entrada. 3) Saída do canal fluídico. 4) Canal fluídico de saída. 5) Entrada do gel e cultura celular. 6) Câmaras de cultura - 6.1. Câmara endosteal; 6.2. Câmara central; 6.3. Câmara perivascular. 7) Portas de contenção interface meio-gel. 8) Portas de contenção interface gel-gel. *Escala: mm.*



Fonte: Autoral.

Na Figura 28, é apresentado um corte de seção mostrando a disposição das entradas/saídas e a geometria das portas que permitem a cultura celular tridimensional em câmaras independentes, mas contínuas. A altura de todos os canais/câmaras no microdispositivo IMNoC foi de $200\ \mu\text{m}$. Na região das portas, a altura mínima foi de $140\ \mu\text{m}$, dimensionamento realizado conforme apresentado na Seção 3.1.

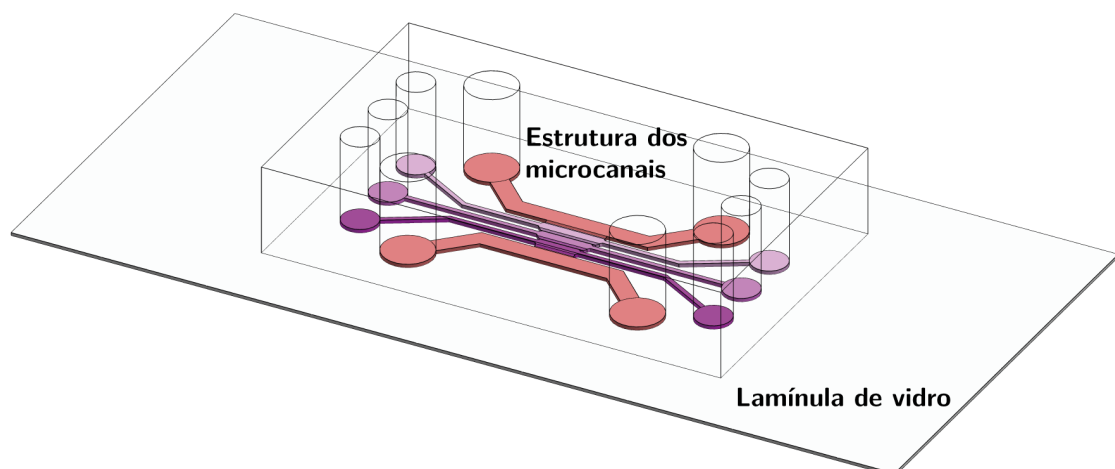
Figura 28 – Vista de seção do projeto do microdispositivo IMNoC. As linhas tracejadas e contínuas representam as entradas, saídas e os canais fluidicos e a câmara de cultura celular tridimensional, respectivamente. *Escala: mm.*



Fonte: Autoral.

Finalmente, na Figura 29, uma vista tridimensional trimétrica do IMNoC montado sobre lamínulas de microscopia é apresentada.

Figura 29 – Vista trimétrica do projeto do microdispositivo IMNoC.



Fonte: Autoral.

4.2 Manufatura, montagem e investigação do IMNoC

A primeira etapa para a manufatura do IMNoC foi a impressão 3D dos moldes contendo as estruturas microfluídicas dos microcanais apresentados na Seção 4.1. Os moldes foram construídos com uma espessura de parede de 2 mm e uma altura de 5,5 mm, a fim de garantir a estabilidade da estrutura após o tratamento térmico, evitando um empenamento da peça e o não extravasamento do material depositado (Figura 30). Esses moldes passaram por todos os processos de cura, pós-cura e tratamento térmico como reportado na Seção 3.1.

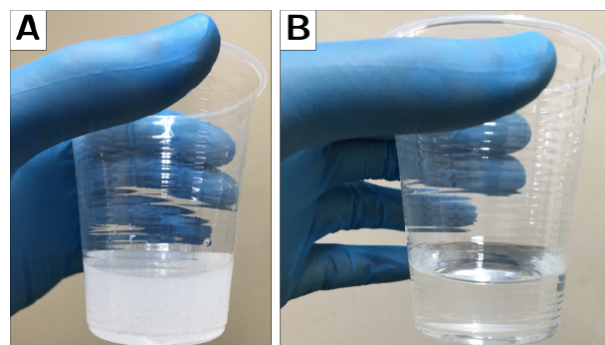
Figura 30 – Molde do IMNoC baseado na manufatura aditiva por impressão 3D.



Fonte: Autoral.

Seguindo o protocolo, o elastômero PDMS foi preparado e depositado nos moldes, imediatamente levados para a cura no forno a 60 °C por 4 horas. Na Figura 31 é evidenciado a importância da etapa de degaseificação do PDMS desde que no seu preparo haja a formação de muitas bolhas devido ao processo de homogeneização das partes que o formam (Figura 31A). A degaseificação do PDMS pré-cura é fundamental para a retirada das bolhas que potencialmente ficariam presas na estrutura, prejudicando a transparência óptica e a integridade dos microcanais.

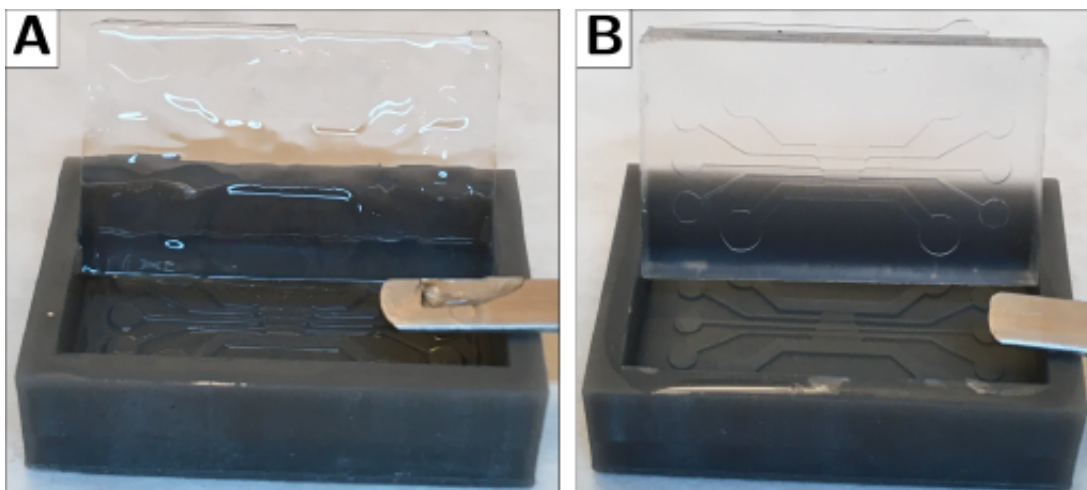
Figura 31 – Preparo do PDMS para *soft-lithography*: (A) Solução de elastômero e agente de cura imediatamente após a homogeneização. (B) Solução de elastômero e agente de cura imediatamente após a degaseificação.



Fonte: Autoral.

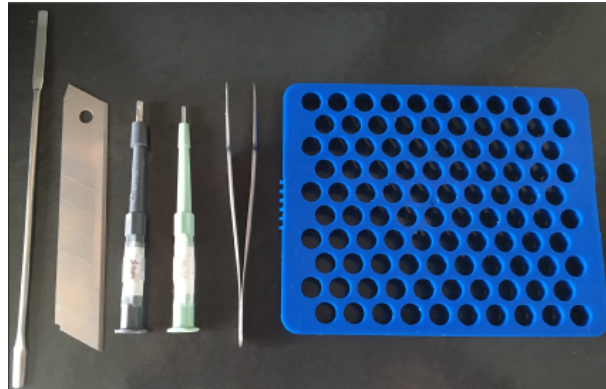
Conforme descrito na Seção 2.2.2.1, a pós cura e o tratamento térmico são processos fundamentais para a fabricação dos moldes baseado em resina por intermédio da impressão 3D. Em suma, a presença dos monômeros e fotoiniciadores na superfície do molde inibe a cura do PDMS (Venzac et al., 2021), impedindo que as microestruturas estejam representadas fielmente no microdispositivo. A fim de se avaliar esse comportamento para o material e o protocolo de tratamento térmico/pós cura utilizados nesta presente tese, duas configurações foram testadas para a fabricação do microdispositivo: molde 3D impresso sem tratamento/pós cura (Figura 32A) e com tratamento térmico/pós cura (Figura 32B). O resultados corroboram que o protocolo utilizado para esses processos, 2 horas no UV e 24 horas no forno a 60°C, baseados no trabalho de Venzac et al. (2021), foram suficientes para que houvesse uma réplica adequada dos microcanais no PDMS (Figura 32B), além de mostrar impossível a réplica quando utilizado o molde não tratado, evidenciando a inibição da cura do PDMS (Figura 32A).

Figura 32 – Cura do PDMS nos moldes de resina: (A) Inibição da cura no molde não tratado. (B) Réplica total das microestruturas no PDMS no molde tratado.

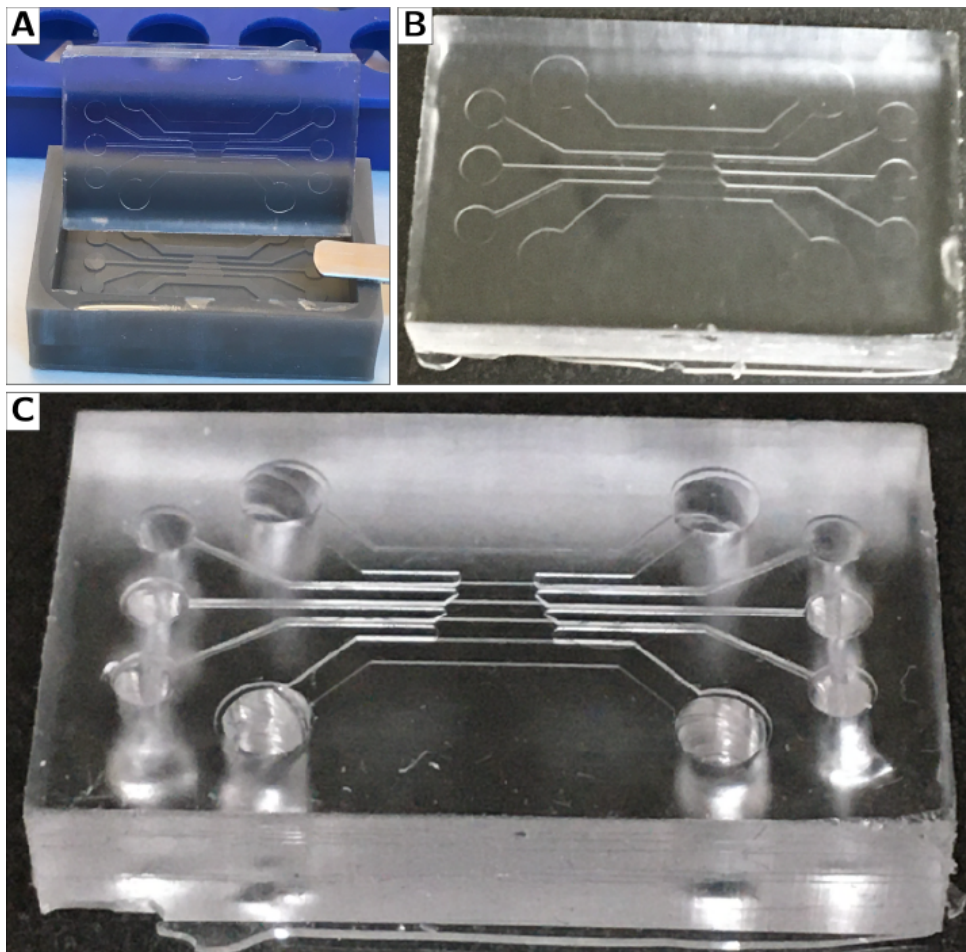


Fonte: Autoral.

Após a cura completa do PDMS no molde de resina, ele foi removido, cortado e furado. Nessa etapa foram utilizadas uma espátula metálica, uma lâmina de corte, dois punções de biópsia, um suporte para fazer os furos e uma pinça para manuseio (Figura 33). Com a espátula metálica e a lâmina de corte destacou-se o PDMS das paredes laterais e da base do molde, etapa sendo realizada gentilmente para evitar danos à estrutura dos microcanais (Figuras 34A e 34B). Apoiado pelo suporte, foram construídas as entradas e saídas de fluido com a punção de biópsia de 3 mm e o acesso para preenchimento do hidrogel com a punção de 2 mm (Figura 34C). Essa etapa também precisa ser feita lentamente e com movimentos vertical e rotacionais, a fim de se evitar o rompimento da estrutura do PDMS próximo às bordas.

Figura 33 – Utensílios utilizados para a fabricação do IMNoC.

Fonte: Autoral.

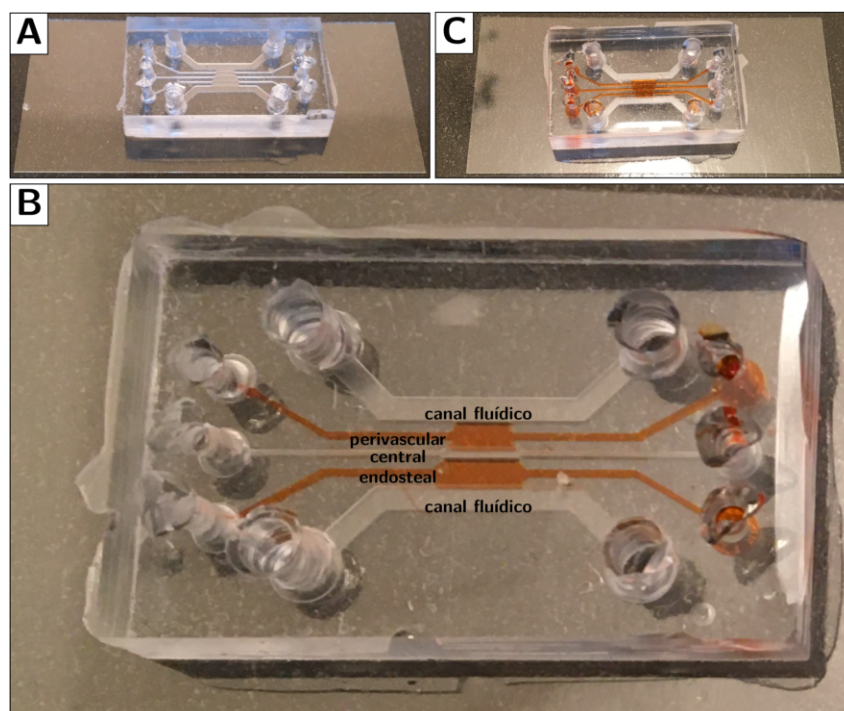
Figura 34 – Manufatura do IMNoC: (A) Destacamento do PDMS do molde de resina. (B) Corte e detalhamento da estrutura de PDMS. (C) Furos fabricados no IMNoC.

Fonte: Autoral.

A primeira observação, realizada por inspeção visual, em relação à manufatura dos IMNoC foi de que não detectou-se os fenômenos de decaimento e/ou emparelhamento nas estruturas, corroborando que as inequações apresentadas por Qin et al. (2010) e Xia and Whitesides (1998) realmente são válidas para essa técnica de manufatura, e que, principalmente, a razão de aspecto projetada se manteve, ou não se alterou significativamente, nos moldes tridimensionais impressos em resina.

Com a finalidade de se realizar uma avaliação prévia da eficácia do projeto das portas de contenção, um experimento simplificado foi realizado utilizando os IMNoCs. Microdispositivos recém destacados foram colocados sobre lamínulas limpas, e pressionados levemente, gerando uma ligação natural entre as duas superfícies (Figura 35A). Essa ligação foi suficiente para permitir o escoamento de fluido apenas no sentido dos canais e compartimento de cultura, sem vaziar pela lamínula para fora dos microdispositivos. Com o auxílio de uma pipeta P20 2-20 μL , corante laranja diluído em álcool 70 % foi injetado na câmara perivascular e endosteal.

Figura 35 – Montagem prévia do sistema completo do IMNoC: (A) Estrutura de PDMS fixada naturalmente à lamínula de vidro. (B) Preenchimento independente das câmaras perivascular e endosteal. (C) Preenchimento independente de todas as câmaras de cultura.



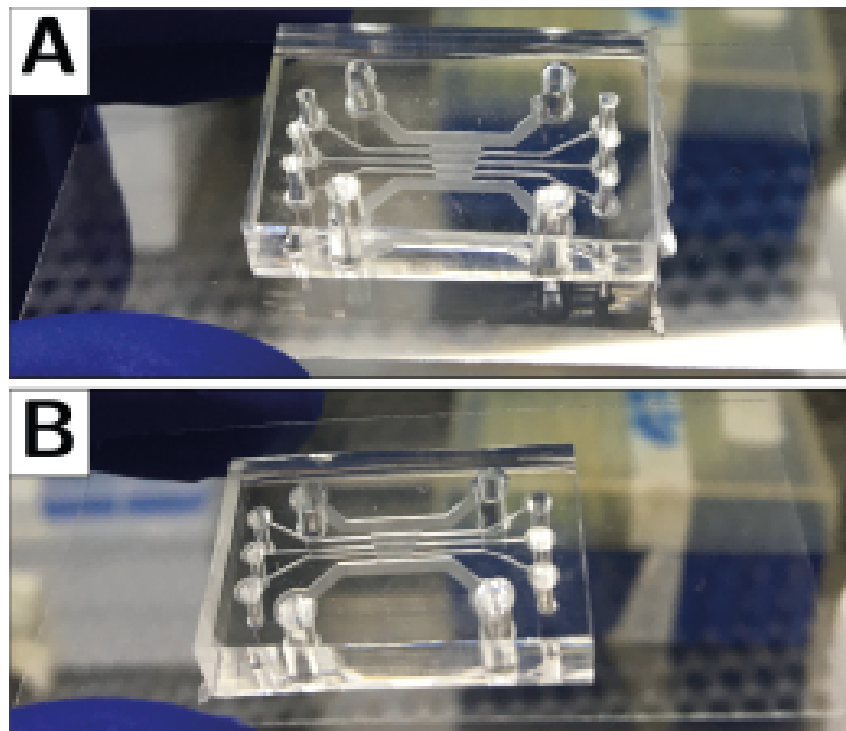
Fonte: Autoral.

Os resultados dessa primeira avaliação mostram que o projeto das portas foi eficaz no impedimento do extravasamento do líquido para as câmaras vizinhas, como pode ser visto na ausência de líquido nos canais fluídicos e na câmara central de cultura (Figura 35B). Somado a isso, quando a câmara central é preenchida os canais fluídicos continuam sem a

presença de fluido (Figura 35C), o que indica que o fluido injetado escoou apenas por essa câmara e não exerceu pressão extra às câmaras vizinhas. Considerando que esses canais serão preenchidos com hidrogéis, fluidos mais viscosos do que a solução utilizada nesse experimento, apresentando então uma ainda maior resistência ao escoamento transversal (ΔP_2), os resultados iniciais indicam que a geometria proposta possibilitou a criação de microambientes independentes de cultura nas três câmaras do IMNoC.

Seguindo as etapas de construção do dispositivo microfisiológico IMNoC, a estrutura em PDMS com os padrões foi ligada à lamínula de vidro por meio do método de plasma de oxigênio. A aplicação do protocolo de vedação estabelecido nesta presente tese resultou em uma montagem completa no microdispositivo IMNoC, conforme apresentado nas Figuras 36A e 36B. Observando as figuras é possível identificar perfeitamente o contorno de todas as estruturas dos microcanais que formam o IMNoC, confirmando a ligação completa entre a superfície do PDMS e da lamínula. Esse resultado corrobora a aplicação em microfluídica do plasma de oxigênio para realização de tratamentos superficiais em diversas abordagens, incluindo na construção de microdispositivos baseado em PDMS para a biomimetização da MO (Nelson et al., 2019; Glaser et al., 2020; Ma et al., 2020). Além disso, ele indica que a utilização de moldes tridimensionais impressos em resina acrílica, pós-curados em luz UV e tratados termicamente, não interferem na eficiência desse processo.

Figura 36 – Montagem completa do IMNoC após vedação utilizando o plasma de oxigênio. (A) Vista superior do IMNoC. (B) Vista inferior do IMNoC.



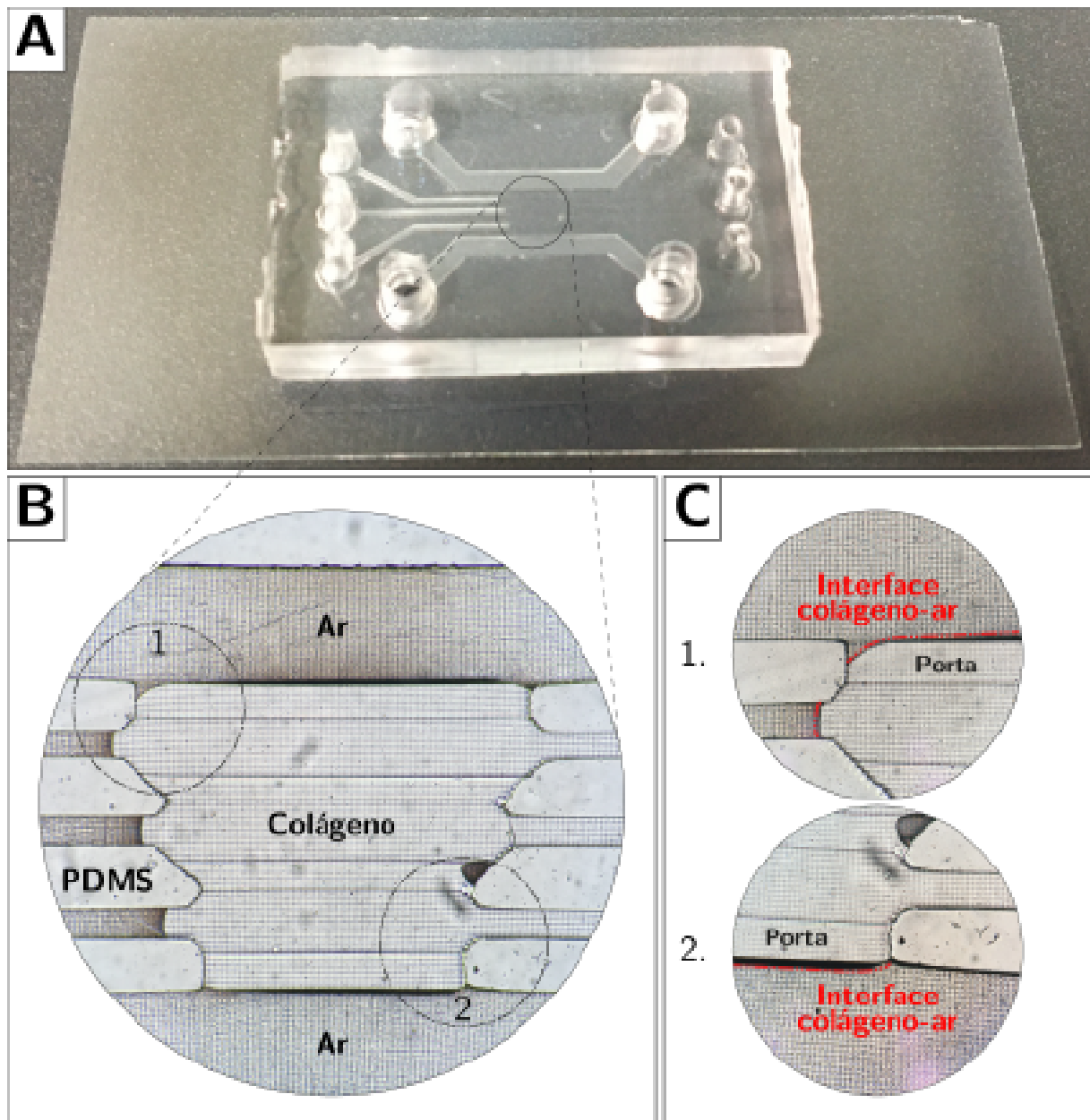
Fonte: Autoral.

É digno de nota discutir sobre a duração da mudança na natureza e propriedade das superfícies, especificamente a hidrofobicidade/hidrofilicidade. Em relação ao PDMS, a mudança do comportamento hidrofóbico para o hidrofílico devido ao tratamento superficial utilizando o plasma de oxigênio é reversível, apresentando em média uma vida útil de duas semanas (Hillborg and Gedde, 1999; Bodas and Khan-Malek, 2007). Em aplicações microfluídicas, a natureza hidrofílica de uma superfície é fundamental para um melhor preenchimento dos microcanais com fluidos, tais como o meio de cultura ou o hidrogel de colágeno, além de minimizar a formação de bolhas, artefatos que são fatais para a manutenção das células e podem afetar significativamente o escoamento intersticial (Matellán Martín, 2015). Ainda de acordo com Matellán Martín (2015), alguns autores recomendam um pré-preenchimento dos canais, como meio de estender a hidrofilicidade adquirida, técnica útil quando é detectada uma vida útil de modificação química superficial muito reduzida. Neste cenário, visando uma melhor operação fluídica do microdispositivo, os ensaios foram realizados no prazo máximo do tempo da vida útil, sendo fabricados e montados novos dispositivos de acordo com a demanda experimental.

A última etapa para a conclusão da manufatura e montagem dos IMNoCs foi o preenchimento das câmaras de cultura com o hidrogel, construindo a matriz tridimensional que efetivamente será utilizada para a cultura de células em um microambiente biomimético da MO. Colágeno tipo I 4 mg/mL, preparação protocolada na Seção 3.2.1, foi inserido, com o auxílio de uma pipeta P20 2-20 μL , nos compartimentos perivascular, central e endosteal como mostrado na Figura 37. Na Figura 37A, é possível observar que a inserção de colágeno nos compartimentos de cultura ocorreu exatamente até preencher toda a estrutura central. Optou-se por essa abordagem para se evitar qualquer chance de extravasamento, considerando os desafios manuais de se inserir fluidos com maiores viscosidades em microcanais, aplicando a mínima pressão necessária possível nas pipetas. Esse preenchimento parcial em nada afeta o escoamento do fluido intersticial, desde que a região de interesse continue sendo os compartimentos centrais e as novas condições de contorno sejam incorporadas no modelo computacional de fenômenos de transporte. Em uma análise mais detalhada, imagens foram retiradas utilizando um microscópio invertido de campo claro nos aumentos de 10X (Figura 37B) e 40X (Figura 37C). Analisando as figuras, especialmente nas portas de contenção, estão presentes, e representadas, as regiões de interface colágeno-ar, validando a sua função e os protocolos de manufatura utilizados. Os resultados apresentados indicam que a geometria proposta para o IMNoC foi capaz de restringir a matriz de colágeno aos compartimento projetados para a cultura das células, gerando assim um microambiente *in vitro* contínuo idealizado mais fidedigno ao que as células experimentam *in vivo* para a MO, permitindo uma livre movimentação celular entre os nichos, além de uma melhor distribuição espacial do escoamento de fluido e transporte de soluto. O conceito da utilização das estruturas, aqui chamadas de portas, para esse fim, é uma proposta inovadora, não sendo identificada em nenhum dos artigos

sistematicamente revisados para o desenvolvimento deste projeto (Rosalem et al., 2020). O principal componente de inovação é a utilização da impressão 3D, técnica que permite a criação de estruturas com espessuras diferentes, procedimento não trivial quando se utiliza o método convencional de litografia.

Figura 37 – Etapa teste de preenchimento do microdispositivo IMNoC com hidrogel de colágeno tipo I 4 mg/mL. (A) Imagem macro dos canais preenchidos com colágeno e com ar. (B) Imagem do compartimento de cultura com colágeno e dos canais fluídicos. (C) Imagens indicando as regiões de interface colágeno-ar.



Fonte: Autoral.

4.2.1 Análise das dimensões do IMNoC

Na Tabela 4, são apresentados os resultados para as dimensões nas coordenadas XY do molde dos microdispositivos IMNoCs. As estruturas analisadas foram: entrada/saída de fluido (E/S_f); canal de fluido (C_f); entrada/saída de colágeno (E/S_{col}); canal de colágeno (C_{col}); compartimento de cultura (Co_{cul}); compartimento perivascular de cultura (Co_{peri}); compartimento central de cultura (Co_{cent}); compartimento endosteal de cultura (Co_{endo}); portas na interface fluido/colágeno ($P_{f/col}$); portas na interface colágeno/colágeno ($P_{col/col}$). Além disso, os termos MF, MF_{M-DP} , CV e MP significam, respectivamente, Modelo Físico, Modelo Físico Média-Desvio Padrão, Coeficiente de Variância e Modelo Projetado.

Tabela 4 – Comparativo entre as principais dimensões do modelo físico e do projetado. Todos os valores estão apresentados em μm .

Estrutura	MF			MF_{M-DP}	CV	MP	Erro
	D1	D2	D3				
E/S_f	1368,5 ±	1369,9 ±	1373,1 ±	1370,5 ±	0,17 %	1410	2,80 %
	9,74	6,84	5,65	2,73			
C_f	990 ±	989 ±	992 ±	990 ±	0,12 %	1000	0,97 %
	4,07	4,11	3,60	1,20			
E/S_{col}	965 ±	967,29 ±	966,54 ±	966,27 ±	0,12 %	1000	3,37 %
	9,93	4,38	4,85	1,16			
C_{col}	232,22 ±	242,49 ±	240,01 ±	238,24 ±	2,25 %	250	4,70 %
	6,71	3,37	4,39	5,35			
Co_{cul}	491,36 ±	487,36 ±	491,35 ±	490,03 ±	0,47 %	500	1,90 %
	4,12	5,12	3,57	2,30			
Co_{peri}	2173,72 ±	2165,61 ±	2174,64 ±	2171,3 ±	0,23 %	2200	1,3 %
	0,77	1,01	0,74	4,97			
Co_{cent}	2752,02 ±	2741,04 ±	2738,14 ±	2743,7 ±	0,27 %	2800	2,03 %
	1,41	1,73	1,82	7,32			
Co_{endo}	3312 ±	3294,92 ±	3328,87 ±	3311,93 ±	0,51 %	3400	2,59 %
	2,59	3,09	2,09	16,97			
$P_{f/col}$	291,37 ±	296,49 ±	295,92 ±	294,59 ±	0,95 %	300	1,9 %
	2,56	2,98	3,39	2,80			
$P_{col/col}$	245,85 ±	243,49 ±	246,4 ±	245,12 ±	0,58 %	250	1,95 %
	3,10	4,08	1,80	1,42			

Fonte: Autoral.

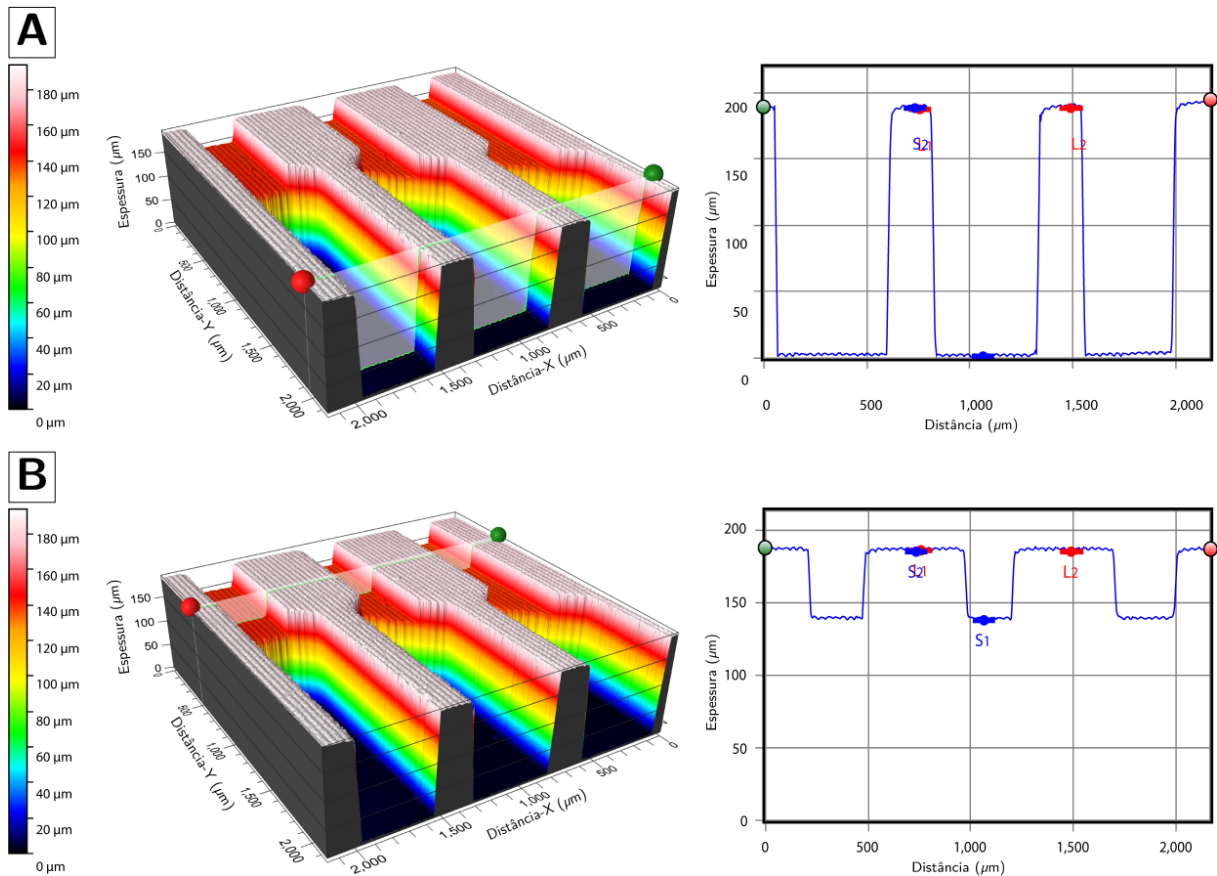
O primeiro passo na análise dos resultados apresentados acima foi abordar o coeficiente de variância. O coeficiente de variância é comumente usado no campo da microfabricação quando se fazem estudos sobre a qualidade e estabilidade dimensional dos manufaturados. Ele é a razão entre o DP e a média, e representa a variação dos dados obtidos em relação à média. Esse parâmetro é aceitável, indicando um conjunto de dados homogêneos, quando for menor a 30 %¹. Na Tabela 4, é mostrado que o coeficiente de variância foi muito baixo para todas as estruturas avaliadas entre os microdispositivos, tendo

¹ Brown, C. E. (1998). Coefficient of Variation. In: Applied Multivariate Statistics in Geohydrology and Related Sciences. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-80328-4_13

máximo de 2,25 % e mínimo de 0,12 %. Isso quer dizer que não ocorreu uma dispersão significativa nos dados para os três microdispositivos estudados. Em outras palavras, a utilização do processo de microfabricação por impressão 3D, considerando apenas as dimensões nas coordenadas XY, possibilitou uma repetitividade e reprodutibilidade necessárias nas estruturas do IMNoC. Entretanto, apesar de não existir uma diferença estatística entre as mesmas dimensões dos microdispositivos, elas diferiram das que foram projetadas, como é possível ver na última coluna da Tabela 4. Contudo, para caminharmos nessa discussão, é necessário considerar também os resultados para a outra coordenada, Z.

Primeiramente, na Figura 38, é apresentado o mapa tridimensional e as curvas dos perfis nos moldes impressos em resina acrílica, gerados pelo software ProfilmOnline.

Figura 38 – Mapa tridimensional do perfil das estruturas do IMNoC. (A) Espessura dos microcanais. (B) Depressão das portas para avaliar a espessura.

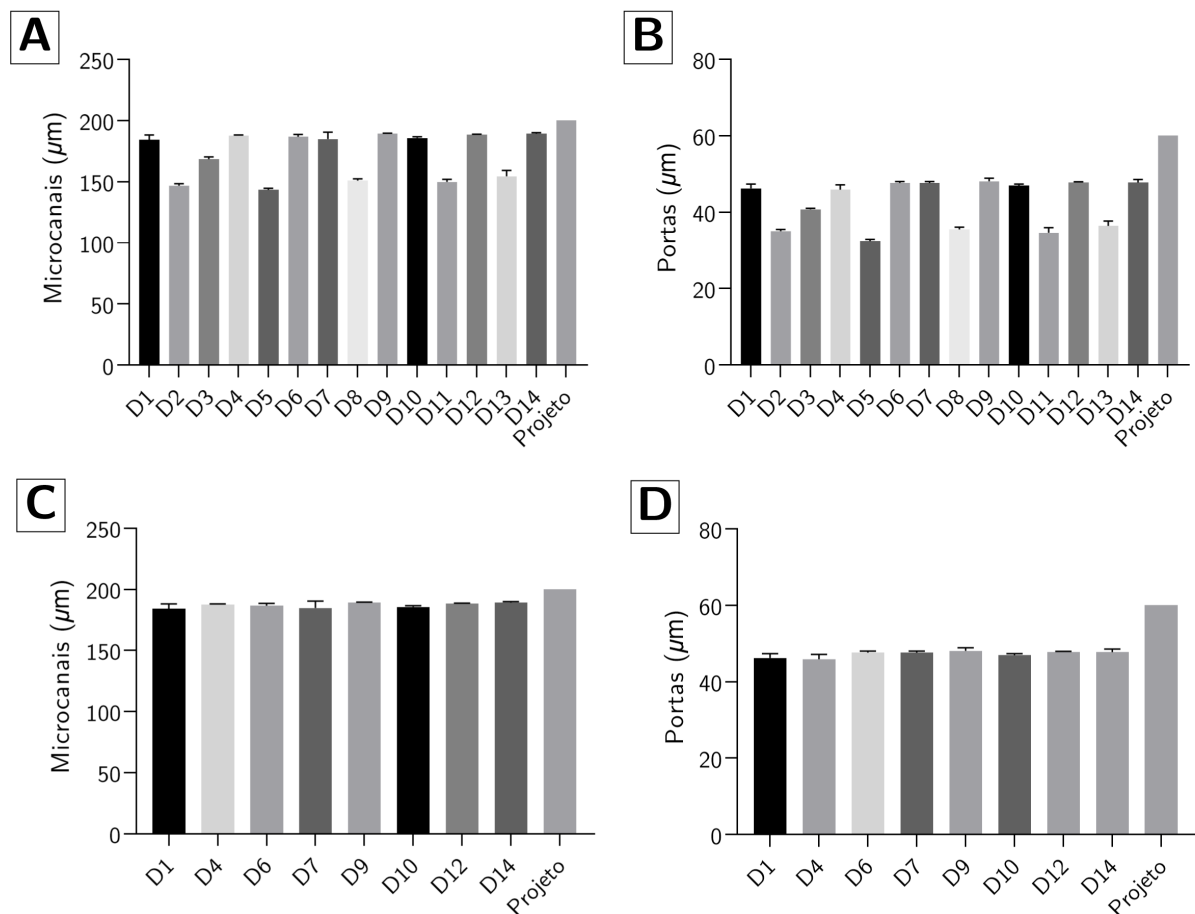


Fonte: Autoral.

Utilizando-se da ferramenta ProfilmOnline, as espessuras foram calculadas, conforme estão apresentados os resultados relativos aos microcanais e as portas de contenção (Figura 39). Os gráficos de barras mostram que, tanto para os microcanais (Figura 39A) como para as portas (Figura 39B), houve uma variação para a espessura medida entre os dispositivos, com a média e o desvio padrão sendo, respectivamente, $172,21 \pm 18,28 \mu\text{m}$ e

42,34 ± 6,00 μm. Entretanto essa variação pode ser agrupada em dois conjuntos com baixa dispersão, ditos homogêneos: o grupo 1 que contém os dispositivos D1, D4, D6, D7, D9, D10, D12 e D14 (Figura 39C); e o grupo 2 que contém os dispositivos D2, D5, D8, D11 e D13 (Figura 39D). A média e o desvio padrão para os microcanais e as portas, além do erro em relação ao modelo projetado, dos respectivos grupos foram calculadas: 1) 187,11 ± 3,01 μm, com erro de 6,45 %, e 47,24 ± 1,02 μm, com erro de 21,27 %; 2) 149,13 ± 4,51 μm, com erro de 25,43 %, e 34,82 ± 1,58 μm, com erro de 41,97 %. Neste cenário, sem utilizar nenhuma métrica estatística para detecção de valores anormais, apenas considerando o erro relativo, o grupo 1 de dispositivos foi considerado como o modelo físico final resultado da manufatura aditiva por impressão 3D.

Figura 39 – Gráficos de barras para as espessuras dos dispositivos. (A) Microcanais fluidicos. (B) Portas de contenção. (C) Microcanais fluidicos - grupo 1. (D) Portas de contenção - grupo 1.



Fonte: Autoral.

Para analisar o efeito dessas variações no funcionamento do IMNoC, duas propriedades foram consideradas. A primeira, denotada por “propriedade volumétrica”, equaciona a variação dos volumes das câmaras como função do erro associado à cada dimensão. Para exemplificar vamos considerar o volume da câmara central de cultura como calculado a

seguir:

$$V_{MP} = C_{o_{cent}} C_{o_{cul}} h_{canal}$$

$$\begin{aligned} V_{MF} &= C_{o_{cent}}(1 - \varepsilon_1) C_{col}(1 - \varepsilon_2) h_{canal}(1 - \varepsilon_3) = C_{o_{cent}} C_{col} h_{canal} (1 - \varepsilon_1)(1 - \varepsilon_2)(1 - \varepsilon_3) \\ &= V_{MP} (1 - \varepsilon_1 - \varepsilon_2 - \varepsilon_3 + \varepsilon_1\varepsilon_2 + \varepsilon_1\varepsilon_3 + \varepsilon_2\varepsilon_3 - \varepsilon_1\varepsilon_2\varepsilon_3) \end{aligned}$$

sendo V_{MP} o volume projetado da câmara, V_{MF} é o volume relativo ao erro dos valores calculados, e ε é o erro relativo à dimensão projetada. Considerando a ordem de grandeza dos erros calculados, o produtos entre eles podem ser negligenciados da equação acima, de modo que a simplificação é escrita como:

$$V_{MF} \approx V_{MP} (1 - \varepsilon_1 - \varepsilon_2 - \varepsilon_3)$$

Logo, para a câmara central, o volume físico é 90,43 % do volume projetado. Do mesmo modo, o perivascular e endosteal são, respectivamente, 90,35 % e 89,06 % do volume projetado.

A segunda propriedade, denotada por “propriedade de transporte”, equaciona a variação da velocidade do fluido como função do erro associado à cada dimensão. Para exemplificar vamos considerar uma velocidade unidimensional no sentido do escoamento na câmara central de cultura como calculado a seguir:

$$v_{MP} = \mathbf{q}/A_{MP} = \mathbf{q}/(C_{o_{cent}} h_{canal})$$

$$\begin{aligned} v_{MF} &= \mathbf{q}/A_{MF} = \mathbf{q}/(C_{o_{cent}}(1 - \varepsilon_1) h_{canal}(1 - \varepsilon_2)) = \mathbf{q}/(C_{o_{cent}} h_{canal} (1 - \varepsilon_1)(1 - \varepsilon_2)) \\ &= \mathbf{q}/(A_{MP} (1 - \varepsilon_1 - \varepsilon_2 + \varepsilon_1\varepsilon_2)) \\ &\approx \mathbf{q}/(A_{MP} (1 - \varepsilon_1 - \varepsilon_2)) \end{aligned}$$

em que \mathbf{q} é a vazão volumétrica, v_{MP} é a velocidade de projeto na câmara, v_{MF} é a velocidade relativa ao erro dos valores calculados, A_{MP} é a área de projeto na câmara e A_{MF} é a área relativa ao erro dos valores calculados. Existem duas velocidades associadas à câmara central. A primeira é a velocidade no interior da câmara, que foi calculada como 109,26 % da velocidade de projeto. E a segunda é a velocidade nas portas de contenção, calculada como 130 % da velocidade de projeto. Do mesmo modo, a perivascular e endosteal são, respectivamente, 108,40 % e 109,94 %, com a velocidade nas portas sendo a mesma da central.

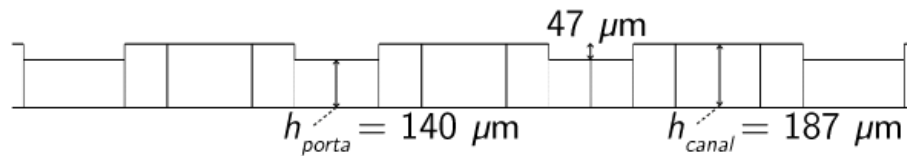
Os resultados apresentados acima demandam uma discussão acerca das “propriedades”, já que os resultados obtidos experimental poderiam divergir consideravelmente dos que foram preditos pelo modelo computacional. A volumétrica está associada ao número de células semeadas no dispositivo considerando uma concentração inicial em suspensão. Do ponto de vista biológico, essas células governam a proliferação e o consumo

de solutos diluídos no meio, especificamente o oxigênio. Da mesma maneira, a “propriedade de transporte” está associada à velocidade de escoamento, estímulo nas células e transporte de soluto pelo termo advectivo. Em ambos os casos, essas propriedades são fundamentais tanto para os experimentos *in vitro* como para os testes *in silico*, em especial o último citado, por ser a ferramenta computacional utilizada para configurar e prever os testes de bancada. Entendendo a importância do exposto previamente para o funcionamento do IMNoC, e tendo em mente que a divergência entre a dimensão projetada e a dimensão física é fruto da própria resolução do processo de manufatura escolhido, a construção de um modelo corrigido precisa então ser pautada por alguns desses novos valores, a fim de se implementar uma plataforma com equivalência experimental e computacional. No projeto do IMNoC, uma das características inovadoras na geometria foi a construção das portas de contenção como lombadas, tal como apresentado e discutido nas Seções 4.1 e 4.2. As equações para o cálculo da pressão de extravasamento que governam essas características são funções da espessura dos microcanais e das portas (Equações 3.1 e 3.2), e desde que o confinamento das regiões de cultura, e a cultura independente dos nichos, sejam um dos pontos principais desse novo dispositivo microfisiológico, a nova geometria precisa ser gerada a partir da alteração dessas dimensões.

Considerando o grupo 1 de dispositivos como o escolhido para representar o modelo físico final, os novos valores para a espessura dos microcanais (h_{canal}) e das portas de contenção ($h_{canal} - l_{porta}$) foram ajustados para a aproximação da média obtida, $187 \mu\text{m}$ e $47 \mu\text{m}$, respectivamente. Essas novas dimensões mantêm as relações para as pressões de avanço e de extravasamento, considerando que a nova espessura da região de estrangulamento ($187 \mu\text{m} - 47 \mu\text{m} = 140 \mu\text{m}$) é exatamente a mesma da projetada inicialmente ($200 \mu\text{m} - 60 \mu\text{m} = 140 \mu\text{m}$). Além disso, faz-se necessário modificar também a geometria das portas. Na Figura 39B, é mostrado que a impressão 3D não foi capaz de gerar as portas como arcos de circunferências, tal como apresentado nas Figuras 25, 26 e 28. O perfil encontrado apresentou comprimento fixo e ângulos retos. Como a distribuição das velocidades é também governada por essas estruturas, se torna fundamental fazer essa modificação no modelo numérico. Na Figura 40, é mostrado como ficou o novo projeto do dispositivo IMNoC. O modelo computacional foi atualizado com essas dimensões, e as simulações dos fenômenos de transporte e dinâmica celular foram realizadas considerando esse novo cenário.

Os resultados obtidos com a análise dimensional dos moldes mestres manufaturados sugerem duas hipóteses: (1) a técnica utilizada para se analisar a espessura no eixo Z não foi a adequada; e (2) as dimensões projetadas estão no limite superior da resolução da impressora 3D. Em relação à primeira hipótese, sabe-se que a técnica de perfilometria óptica requer que a superfície analisada seja regular, sem rugosidade, possibilitando o alinhamento das bandas, gerando assim perfis que representem a geometria fabricada. Entretanto, conforme mostrado na Figura 41, a superfície do molde mestre apresenta uma rugosidade,

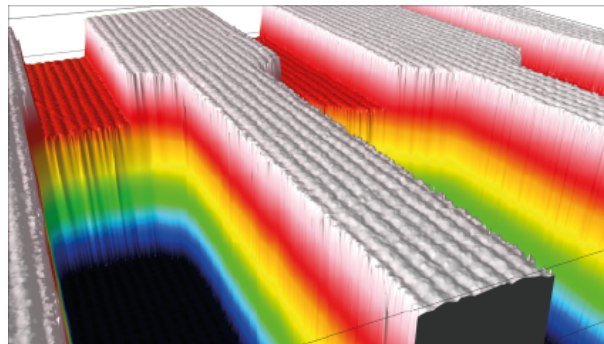
Figura 40 – Nova geometria para as portas de contenção e novas dimensões para as espessuras.



Fonte: Autoral.

que impacta negativamente no espalhamento da luz causado por essa irregularidade, podendo gerar assim perfis divergentes para uma mesma estrutura. Considerando que uma das suposições dos fatores principais que contribuem com a rugosidade é o material utilizado, trabalhos futuros produzindo os moldes com outros tipos de resina poderão trazer respostas sobre a eficácia da perfilometria nessas análises e avaliar a influência do tipo de resina na qualidade superficial dos moldes 3D impressos, além de ser possível indicar a rugosidade como inerente à técnica de impressão 3D de resina acrílica.

Figura 41 – Rugosidade da superfície do molde mestre 3D impressora em resina acrílica.



Fonte: Autoral.

Por fim, devido à existência de um grupo homogêneo de moldes analisados (Figuras 39C e 39D), as configurações da impressão, especificamente a resolução da impressora 3D e o fatiamento, são os principais problemas para a manufatura de moldes dos IMNoC. As especificações técnicas da impressora Photon Mono 4K (3D Anycubic) indicam uma resolução no eixo XY de $35 \mu\text{m}$ e no eixo Z de $10 \mu\text{m}$. Apesar da resolução no eixo XY ser maior do que no Z, por se tratar de maiores dimensões de projeto, o erro relativo foi baixo, indicando uma menor divergência em relação à dimensão original. Por outro lado, a impressão no sentido do eixo Z apresentou um erro muito grande em relação às dimensões dos vão das portas de contenção. Isso ocorre porque essa dimensão no projeto é de $60 \mu\text{m}$, e, apesar da resolução de $10 \mu\text{m}$ para o eixo Z, o ajuste necessário da espessura de camada ter sido $30 \mu\text{m}$ (Tabela 3) fez com que a impressão ocorresse no limite, estando sujeita à

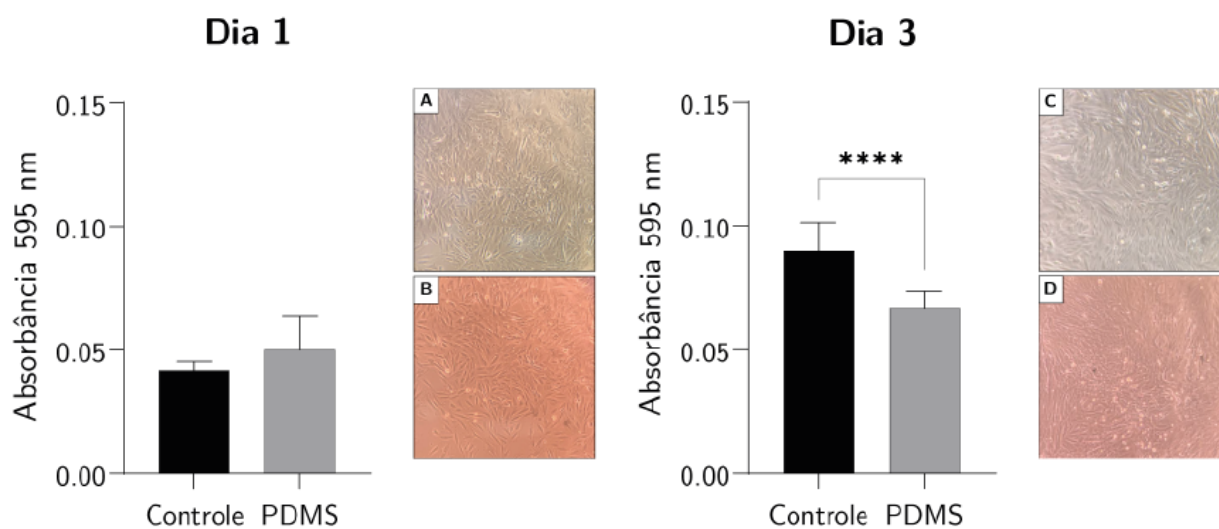
uma maior variabilidade. Um estudo aprofundado sobre as configurações da impressão e o seu impacto na representação física dos modelos computacionais é essencial para a otimização do uso da impressão 3D como técnica consolidada na microfabricação.

4.3 Ensaio MTT

Na Figura 42, são apresentados os resultados do ensaio MTT para as células H9c2, 24 e 72 horas após a cultura, além das imagens representativas para cada configuração. Não existe diferença estatística significativa entre os grupos controle e na presença do PDMS para o primeiro dia. Contudo, pelos níveis de absorvância, detectou-se uma maior proliferação celular para a cultura na presença do PDMS. Em relação às imagens das células aderidas aos poços, qualitativamente, detectou-se uma distribuição celular similar entre os grupos, além de uma morfologia homogênea (Figuras 42A e 42B).

Analisando o MTT para o terceiro dia de cultura, os resultados apresentaram uma diferença estatística significativa, o que indica uma queda na viabilidade celular. Entretanto, apesar dessa diminuição, a viabilidade no grupo teste foi calculada como 76 %, valor maior do que os 70 % definido pela ISO 10993-5:2009(E) como resposta celular à presença de um material potencialmente citotóxico. Qualitativamente, os dois grupos após 72 horas apresentaram os mesmos padrões fenotípicos (Figuras 42C e 42D), apresentando, contudo, diferenças morfológicas e de distribuição espacial em relação ao primeiro dia, indicando o início do processo de diferenciação dos cardiomioblastos.

Figura 42 – Absorvância no MTT e imagens representativas para a cultura das H9c2. (A) Controle para 24 horas. (B) PDMS para 24 horas. (C) Controle para 72 horas. (D) PDMS para 72 horas.

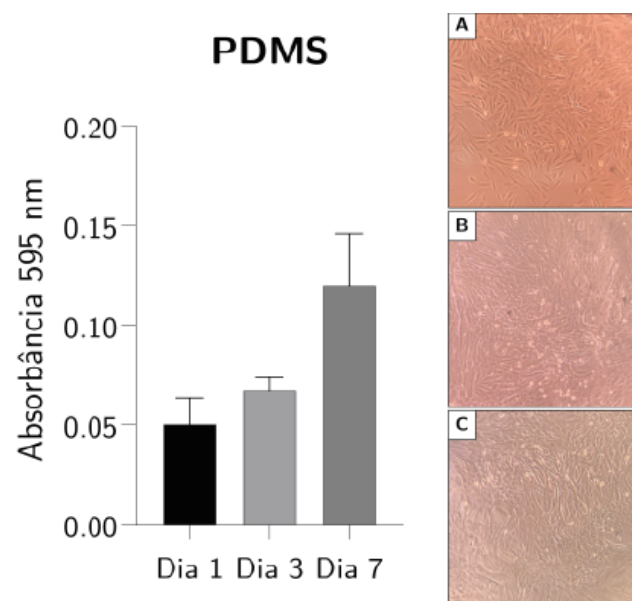


Fonte: Autoral.

Por fim, para avaliar a influência do material teste na viabilidade e proliferação das

células H9c2, um experimento de longa duração (168 horas - 7 dias) auxiliar foi conduzido. Os resultados obtidos mostram que não existe uma diferença estatística significativa entre o primeiro e o terceiro dia, porém essa diferença é percebida entre o terceiro e o sétimo dia (Figura 43). Isso indica um aumento no número de células com o tempo, indiretamente quantificando que a viabilidade permitiu a proliferação celular na cultura. Qualitativamente, após a estabilização da cultura das H9c2 (tempo > 24 horas), a morfologia das células foi similar para o terceiro e sétimo dia, sugerindo realmente que as células já estavam se diferenciando e/ou iniciando esse processo.

Figura 43 – Absorbância no MTT e imagens representativas para a cultura das H9c2 no grupo teste. (A) PDMS para 24 horas. (B) PDMS para 72 horas. (C) PDMS para 168 horas.



Fonte: Autoral.

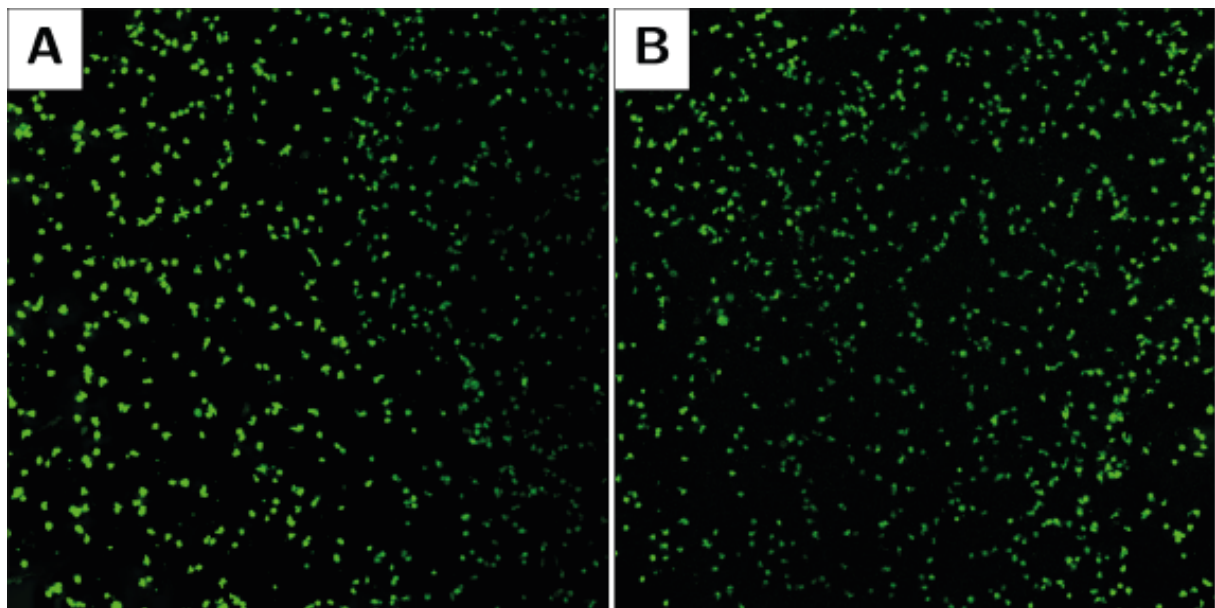
Experimentalmente, o ensaio MTT é um dos métodos aplicados para avaliar e quantificar a atividade mitocondrial de células. A atividade mitocondrial controla o nível do metabolismo celular, que por sua vez está diretamente relacionado à viabilidade das células (Paretsis et al., 2021). Os resultados obtidos com o MTT demonstram que, apesar de existir uma diferença entre o grupo controle e o teste para o terceiro dia de cultura, a atividade metabólica apresentou níveis similares aos controles. Isso sugere que a exposição ao UV e o tratamento térmico aplicados à estrutura de PDMS moldada sobre resina acrílica foi capaz de eliminar componentes citotóxicos específicos que reduzissem significativamente a viabilidade celular (Ferraz et al., 2020), retornando então o elastômero à sua condição natural de biocompatibilidade e não citotoxicidade (Ren et al., 2013). De modo geral, o estudo sugere que o tratamento utilizado foi capaz de tornar a estrutura de PDMS um sistema compatível para a construção de um microdispositivo OoC que permita a cultura de células em um microambiente que possibilite a expressão fenotípica como *in vivo*.

4.4 Cultura celular no IMNoC

O estudo do cultivo celular em uma condição estática tridimensional foi desenhado para validar três hipóteses fundamentais, com resultados prévios reportados neste trabalho, sobre o projeto da plataforma *in vitro* IMNoC para a biomimetização da medula óssea fisiológica com os seus nichos integrados: 1) o protocolo utilizado para a fabricação do dispositivo microfisiológico permite a criação de uma plataforma biocompatível e não citotóxica, conforme Seção 4.3; 2) os protocolos de preparo e inserção da solução de células e colágeno tipo I permitem a criação de uma cultura celular em uma matriz porosa, conforme Seções 3.3 e 4.5; e 3) a geometria projetada permite a geração de um microambiente tridimensional e fisicamente contínuo entre os três nichos da medula óssea.

No âmbito da primeira hipótese, na Figura 44, é mostrada a análise de viabilidade celular, para todos os compartimentos de cultura, especificamente os conjuntos perivascular-central (Figura 44A) e central-endosteal (Figura 44B).

Figura 44 – Imagens representativas da viabilidade das células Jy nas câmaras de cultura no microdispositivo IMNoC. (A) Perivascular-central. (B) Central-endosteal. *Aumento: 10X.*



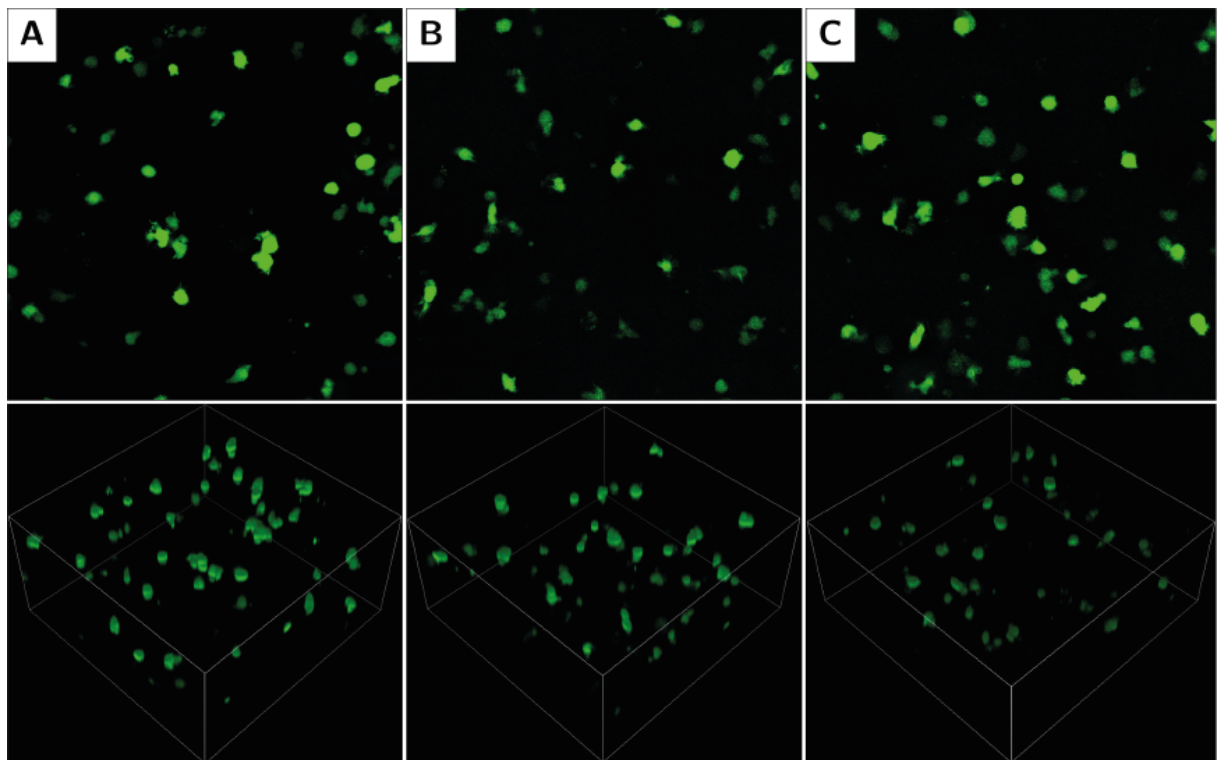
Fonte: Autoral.

As imagens mostram que as células Jy não aderentes se mantiveram viáveis após 24 horas de cultura estática em uma matriz tridimensional porosa de colágeno tipo I. Esse resultado corrobora o apresentado previamente no ensaio MTT para avaliação da atividade metabólica das células musculares, mas nesse caso para as tumorais que emulam a LLA.

Além da viabilidade celular, o microambiente também influencia diretamente na morfologia das células. Em uma análise mais detalhada, detectou-se que as células em

cada nicho, especificamente o perivascular (Figura 45A), central (Figura 45B) e endosteal (Figura 45C), apresentaram formato pseudo-esférico similar ao reportado para uma cultura 3D estática, em matriz de colágeno 2 mg/mL, de células não aderentes SUP-B15, linhagem de linfoblastos de células B, retiradas da medula de pacientes com LLA (Bruce et al., 2015). Embora as células não aderentes expressem na sua superfície proteínas de adesão, como por exemplo a integrina, e terem no seu citoesqueleto a presença do maquinário de actomiosina, que em conjunto formam mecanismos para a mecanossensibilidade e mecanotransdução estimuladas pela MEC e pelos tipos celulares ao redor (Ivanovska et al., 2015), a morfologia dessas células em um ambiente tridimensional é majoritariamente esférica/elipsoide, diferentemente do formato estrelado/espalhado ("*spread*") das células aderentes nesse mesmo ambiente. Além da imprescindível importância para a viabilidade e morfologia das células, as características elencadas para um microambiente relevante também corroboram as duas últimas hipóteses fundamentais definidas para um projeto eficiente da plataforma microfisiológica.

Figura 45 – Imagens representativas da viabilidade e morfologia das células Jy em cada nicho da medula óssea. (A) Perivascular. (B) Central. (C) Endosteal. *Aumento: 40X*

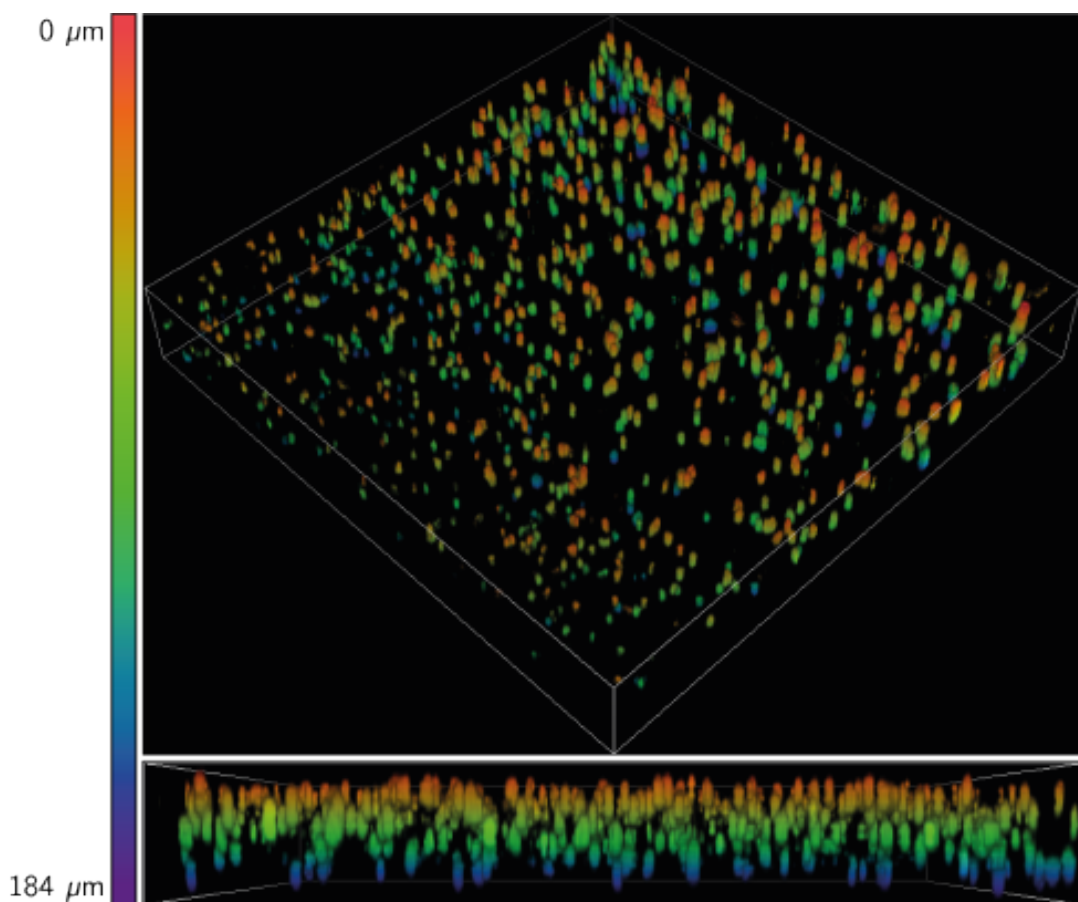


Fonte: Autoral.

Conforme previamente explicitado nas imagens inferiores da Figura 45, foi possível detectar uma organização tridimensional das células nas câmaras de cultura no IMNoC. Procurando por uma visão macro desse comportamento, na Figura 46, é apresentada a

distribuição espacial das células após 24 horas de cultura estática nas regiões combinadas perivascular-central (Figura 46A) e central-endosteal (Figura 46B). Observa-se após esse tempo de cultura uma distribuição 3D em todos os eixos (x , y e z). Especialmente em relação ao eixo z , os resultados mostram que as células se mantiveram distribuídas ao longo de $184 \mu\text{m}$, praticamente a altura de $187 \mu\text{m}$ projetada para os canais do microdispositivo, indicando que o preparo e inserção da solução de células e colágeno tipo I foram capazes de gerar um microambiente celular espacialmente semelhante ao que se espera *in vivo* nos nichos da medula óssea.

Figura 46 – Imagem representativas da distribuição das células Jy nas câmaras de cultura no microem cada nicho da medula óssea. (A) Perivascular-central. (B) Central-endosteal. *Aumento: 10X*

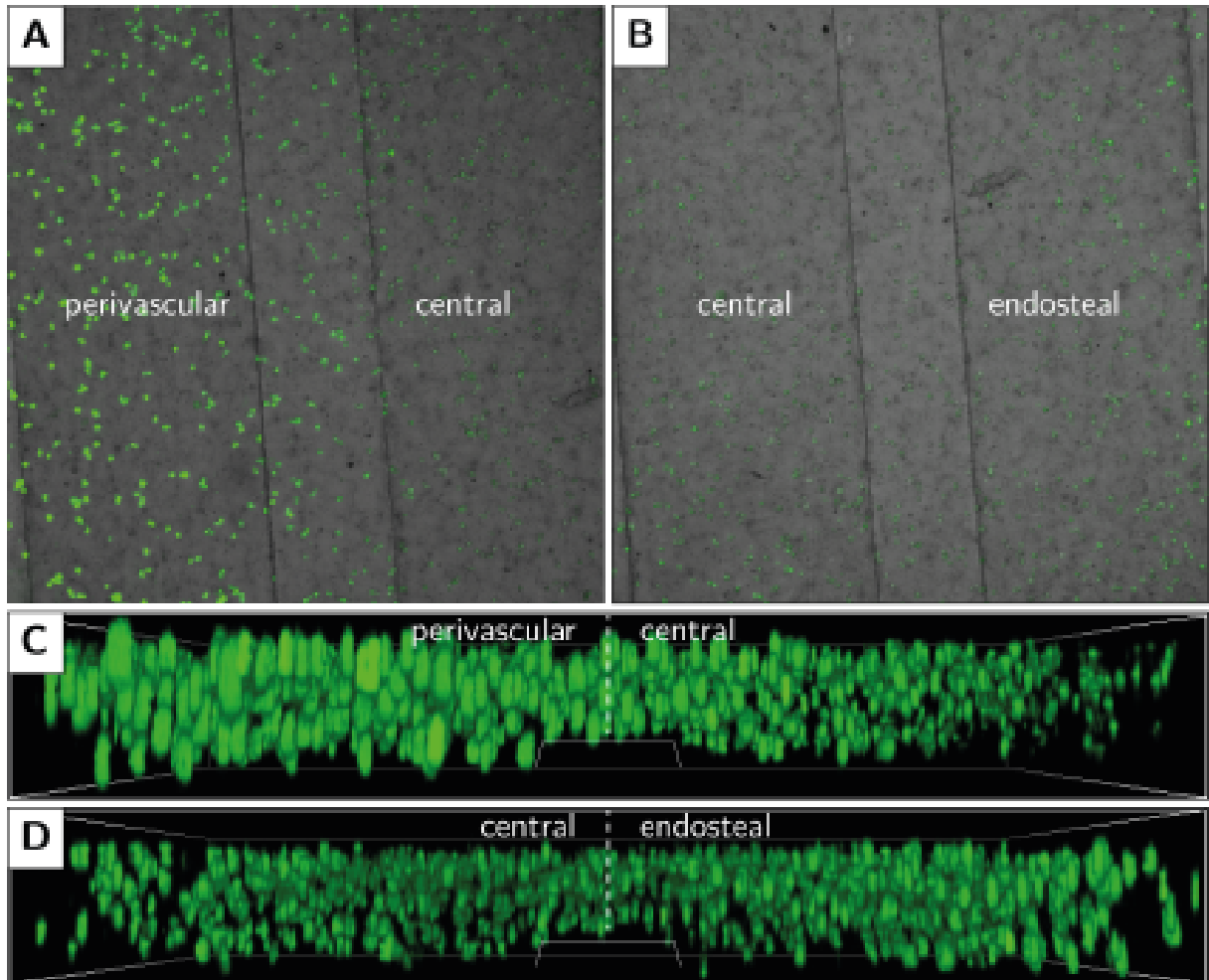


Fonte: Autoral.

Por último, na Figura 47, é apresentada a característica mais relevante do projeto dessa nova plataforma microfisiológica, definida como a última hipótese: a integração entre todos os nichos da MO *in vitro* por meios de câmaras independentes para cultura. Os resultados apresentados nas Figuras 47A e 47B mostram uma integração completa e contínua entre todos os nichos, com a presença de células nas respectivas câmaras de cultura e ao longo da região de contenção das portas. Além disso, as Figuras 47C e 47D apresentam uma imagem de seção da cultura onde é possível identificar a presença da

estrutura da porta de contenção e a distribuição das células ao seu redor. Esses últimos resultados confirmam a total conexão entre as câmaras representativas dos nichos da MO.

Figura 47 – Imagem representativa da integração física e biológica entre todos os nichos *in vitro* do IMNoC. (A) Nichos perivascular-central. (B) Nichos central-endosteal. (C) e (D) Influência da porta de contenção na formação da integração entre os nichos.



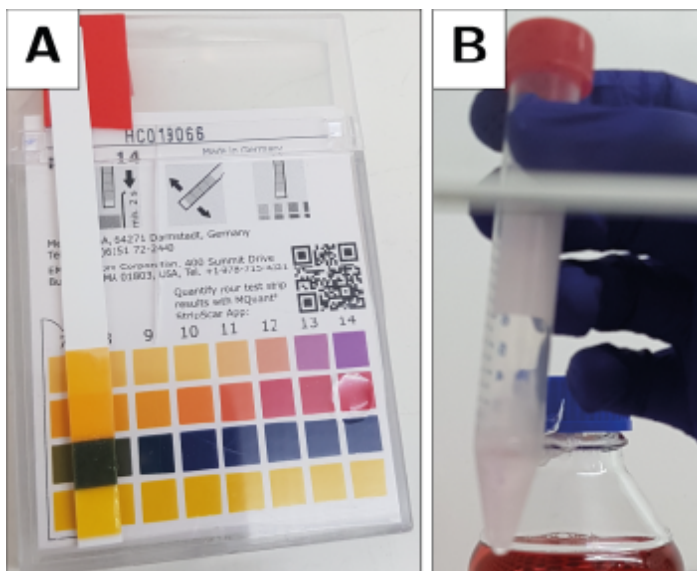
Fonte: Autoral.

Os estudos preliminares sobre o funcionamento experimental da nova plataforma IMNoC para a biomimetização da MO indicam a capacidade de se realizar cultivos independentes tanto para as propriedades biológicas quanto para as mecânicas *in vitro*. Sendo assim, o IMNoC se configura como uma plataforma de potencial biomimetização fiel da MO *in vitro* por meio de um microambiente inerte para a cultura celular, incorporando estímulos mecânicos e físicos, confinamento tridimensional e interações células-MEC (Huh et al., 2011), estimulando as células a desempenharem as suas funções como *in vivo*, especificamente no que diz respeito à comunicação celular por intermédio dos fatores de crescimento e citocinas parácrinas ou autócrinas, fundamentais para os processos hematopoiéticos, como a linfopoese e a eritropoese, e, principalmente, os leucêmicos.

4.5 Estudo microestrutural

Primeiramente, a acidez da solução de colágeno foi ajustada para um pH neutro, caracterizado por uma acidez/basicidade ao redor de 7,4 (Figura 48A) e uma coloração rosa clara (*soft pink*) (Figura 48B) quando preparada na presença de vermelho de fenol, condição fundamental e necessária para o cultivo celular padrão *in vitro*. Além da importância biológica, o pH é um parâmetro chave na regulação das propriedades estruturais e mecânicas da estrutura do colágeno, com por exemplo o diâmetro das fibras, diâmetro dos poros e o módulo de elasticidade (Yamamura et al., 2007; Raub et al., 2008), sendo importante o seu ajuste e análise durante as experimentações (Antoine et al., 2014).

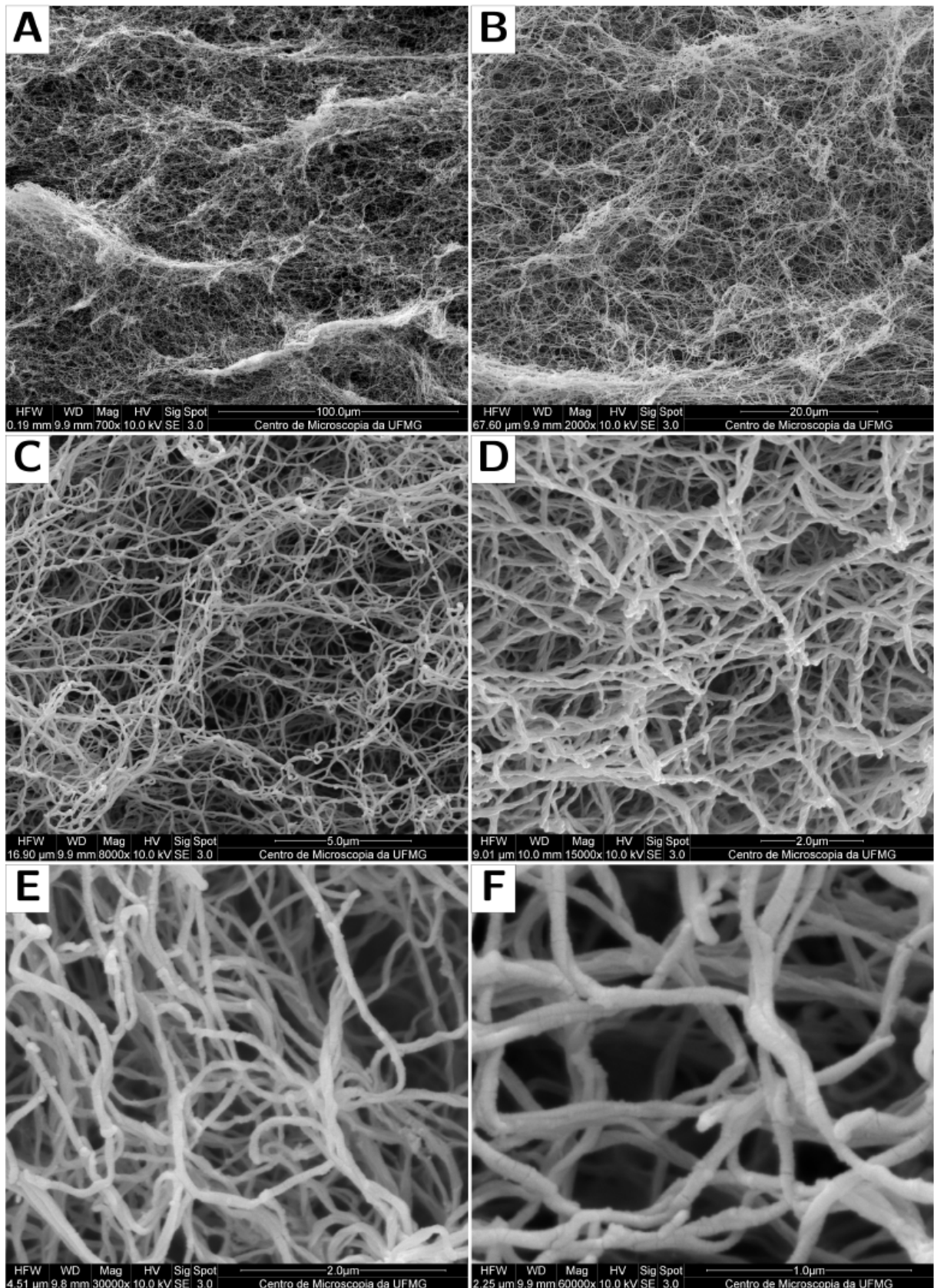
Figura 48 – Ajuste do pH da solução de colágeno. (A) Análise quantitativa do pH utilizando uma fita de pH. (B) Análise qualitativa do pH pela coloração da solução de colágeno.



Fonte: Autoral.

Na Figura 49, são mostradas algumas das imagens MEV adquiridas para analisar a microestrutura do gel, explicitando as principais características da malha do colágeno 4 mg/mL não comercial (Kitten et al., 1996). Quando comparado a um colágeno em menor concentração, a malha do hidrogel apresentou uma maior densidade, contendo um maior número de fibras. Esse resultado foi corroborado por meio das imagens MEV reportadas no trabalho de Valverde et al. (2016), que estudaram várias concentrações do mesmo colágeno, especificamente entre 1,5 e 2,5 mg/mL, para avaliar a migração celular. Como já reportado nos trabalhos de Lai et al. (2012a,b) e Moreno-Arotzena et al. (2015), a rede de colágeno apresentou padrões torcidos, formados por fibras entrelaçadas (Figura 49E e 49F). Essa característica se mostrou então independente da concentração de colágeno, sendo uma formação intrínseca da estrutura dessa proteína.

Figura 49 – Imagens do MEV da microestrutura tridimensional do hidrogel e das fibras de colágeno. (A) Amplificação de 700 X. (B) 2 kX. (C) 8 kX. (D) 15 kX. (E) 30 kX. (F) 60 kX.



A caracterização da microestrutura do hidrogel foi realizada qualitativamente e também quantitativamente, especificamente por meio da medida dos parâmetros de porosidade, diâmetro dos poros e das fibras. Na Tabela 5, são apresentados os valores obtidos no presente estudo.

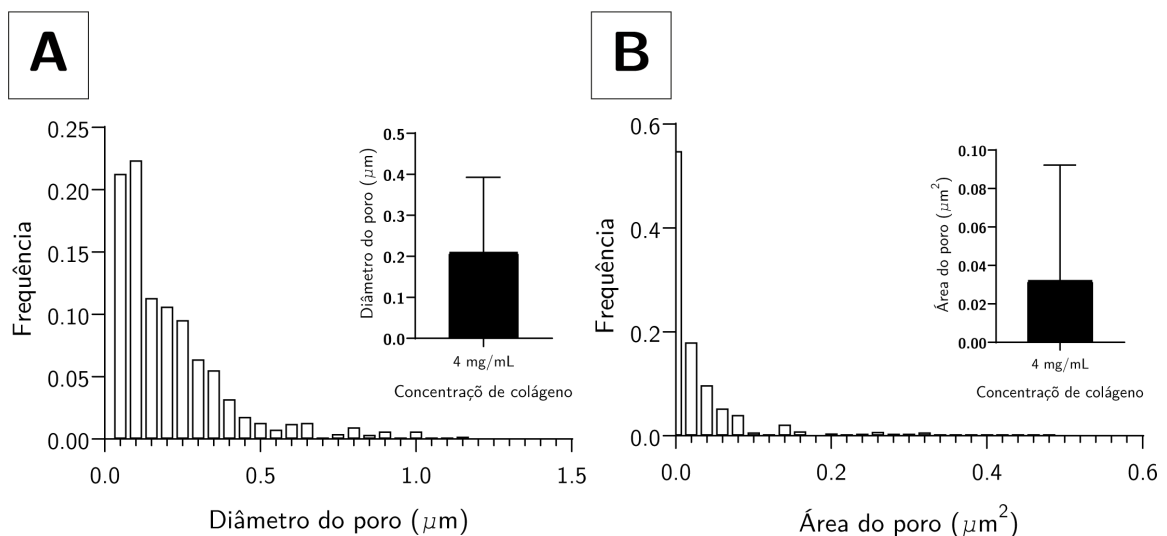
Tabela 5 – Características microestruturais do hidrogel de colágeno tipo I 4 mg/mL.

Colágeno	
Porosidade (%)	49,63 ± 2,48
Diâmetro dos poros (nm)	209 ± 183
Diâmetro das fibras (nm)	75,82 ± 14,77

Fonte: Autoral.

O primeiro parâmetro avaliado, a porosidade, foi calculado como sendo aproximadamente 49 %, porosidade significativamente menor do que a calculada para um colágeno 2 mg/mL, especificamente 89 % (Polacheck et al., 2014), resultado esperado visto a diferença na densidade da malha para essas concentrações. O diâmetro obtido para os poros e as fibras foi de aproximadamente 209 nm e 75 nm, respectivamente. Em especial aos poros, um outro parâmetro usual é a área do poro, que foi calculado como sendo $0,032 \pm 0,06 \mu\text{m}^2$. Os resultados do diâmetro e tamanho médio do poro apresentaram um desvio padrão significativamente alto. Analisando a Figura 50, os histogramas mostram uma distribuição não normal dos parâmetros e com valores que se afastam da média, mas que não são atípicos (*outliers*). Esse comportamento ocorre devido a existência de uma heterogeneidade natural na formação dos poros.

Figura 50 – Histograma e gráfico de barras para quantificar a geometria dos poros na matriz de colágeno. (A) Diâmetro do poro. (B) Área do poro.



Fonte: Autoral.

Os resultados obtidos nesse trabalho convergem aos reportados nos trabalhos de Raub et al. (2007) e Raub et al. (2008). Utilizando imagens de MEV para uma estrutura de colágeno tipo I 4 mg/mL, pH 7,5 e temperatura de polimerização de 37 °C, e os mesmos métodos de *thresholding* e binarização, os autores obtiveram uma porosidade de 40 % e uma área do poro de 0,023 μm^2 (Raub et al., 2008), aproximadamente. Utilizando de desenhos manuais para a medida dos diâmetros das fibras para um colágeno igual ao citado anteriormente, os autores obtiveram um valor de aproximadamente 62 nm (Raub et al., 2007). Em relação aos diâmetros da fibra, na literatura alguns trabalhos corroboram os valores obtidos, como por exemplo Yamamura et al. (2007), que reportou um valor de 35 nm; Stuart and Panitch (2008) que estima um valor entre 65–75 nm; e Antoine et al. (2014) que cita um intervalo de 12–120 nm para o diâmetro das fibras de colágeno em pH neutro. Contudo, alguns trabalhos divergem em relação aos resultados obtidos nesta tese.

Um exemplo desses trabalhos é o de Antoine et al. (2015). Analisando uma estrutura de colágeno 4 mg/mL, utilizando imagens geradas por um microscópio confocal de reflectância e ferramentas do MATLAB, foram calculados um diâmetro médio de poro e da fibra de $1,63 \pm 0,23 \mu\text{m}$ e $355 \pm 12 \text{ nm}$, respectivamente. Esses valores são significativamente maiores do que os encontrados neste trabalho. Entretanto existem hipóteses que podem explicar essas discrepâncias.

A divergência existente entre os resultados da microestrutura do gel de colágeno pode ser entendida como dependente do método de análise e uma variabilidade natural do material. Em relação à primeira hipótese, os resultados expostos aqui mostram que, apesar das diferenças que ocorrem entre variantes de um mesmo método, existe uma similaridade entre os resultados, sendo a pequena flutuação entre os valores explicada pela hipótese a seguir. Por exemplo, utilizando as técnicas de MEV e microscopia confocal de reflectância, nas palavras de Moreno-Arotzena et al. (2015), “para as fibras de colágeno, a variação dos dados medidos foi bastante alta, provavelmente devido à variabilidade introduzida pelo agrupamento característico”. Em um trabalho de revisão, Antoine et al. (2014) reporta dificuldades recorrentes nas análises de imagens com grande densidade de fibras de colágeno, indicando a concentração de 4 mg/mL como o limite superior do que é feito atualmente com reprodutibilidade aceitável. Por isso, trabalhando próximo ao limite superior, o estudo dessas estruturas pode apresentar esse comportamento variado de amostra para amostra e análise para análise. Somada a isso, a característica microestrutural do hidrogel também é dependente do processo de manufatura do colágeno, variando entre as próprias marcas comerciais e não comerciais.

Por fim, apesar do que foi pontuado, a qualidade da malha do hidrogel de colágeno gerada se assemelha ao apresentado em outros trabalhos que o estudaram, em lotes comerciais e na concentração de 4 mg/mL, pH de 7,5 e temperatura de 37°C (Raub et al., 2007, 2008; Stuart and Panitch, 2008), indicando que os protocolos utilizados para

o preparo do gel estão alinhados com as melhores práticas desse processo e que, mais importante, existe uma reprodutibilidade na estrutura tridimensional dos hidrogéis que permite a comparação dos resultados entre estudos independentes, algo fundamental para a pesquisa científica. Além disso, desde que a literatura reporta que as fibras de colágeno em amostras de tecido *in vivo* apresentem diâmetros de aproximadamente 75 nm (Montes, 1996), a utilização desse colágeno nas condições configuradas neste trabalho de tese é capaz de mimetizar um microambiente com microarquiteturas biologicamente relevantes para estudos *in vitro* sobre comportamento celular.

4.6 Simulação computacional do IMNoC

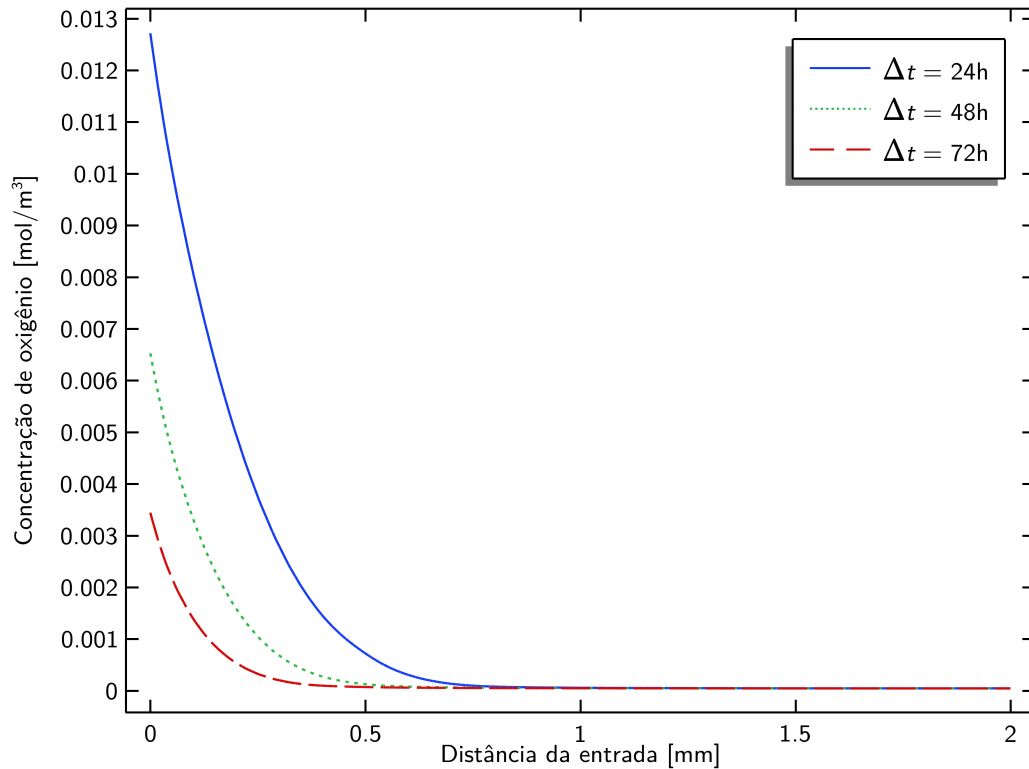
Um modelo 3D completo do microdispositivo IMNoC foi desenvolvido considerando as seguintes propriedades para o escoamento e concentração celular:

- Gradiente de pressão $\Delta P = 29$ Pa, gerando um escoamento intersticial dentro da matriz de colágeno com velocidades entre $0,175 - 0,245 \mu\text{m}/\text{s}$. Essas velocidades são reportadas como fisiológicas para o escoamento ao longo dos ossos e nas cavidades medulares (Hillsley and Frangos, 1994; Dafni et al., 2002).
- Concentração celular n de 1×10^7 células/mL. Essa concentração é utilizada como padrão para a cultura de células em microdispositivos, além de aplicada para a representação de uma população celular da LLA na medula óssea patológica (Bruce et al., 2015).

Nessa configuração, entretanto, utilizando o modelo implementado nessa presente tese, não foi possível gerar o gradiente de oxigênio esperado para representar as diferentes concentrações de oxigênio nos nichos da MO (Figura 51).

Nas primeiras 24 horas, a concentração de oxigênio no nicho perivascular (0,25 mm) já foi muito baixa, aproximadamente $0,004 \text{ mol}/\text{m}^3$ (p_{O_2} 0,4 %), enquanto que nos nichos central (1 mm) e endosteal (1,75 mm) $6,5 \times 10^{-5} \text{ mol}/\text{m}^3$ (p_{O_2} 0,065 %). Ao final do terceiro e último dia, a concentração em todos os nichos estava na ordem de $10^{-5} \text{ mol}/\text{m}^3$ (p_{O_2} 0,01%). Essas concentrações não representam o reportado para as regiões de hipóxia (p_{O_2} 1–6%; $0,01-0,06 \text{ mol}/\text{m}^3$) e muito menos para a condição de normóxia (p_{O_2} 21%; $0,21 \text{ mol}/\text{m}^3$). Neste cenário, foram realizadas simulações considerando novos valores para a concentração de células, variando entre 1×10^6 células/mL (Glaser et al., 2020), 5×10^6 células/mL (Ma et al., 2010) e 1×10^7 células/mL (Bruce et al., 2015), e para a velocidade de escoamento, em um intervalo de $0,1-5 \mu\text{m}/\text{s}$ (Marturano-Kruik et al., 2018). Entre essas combinações, um gradiente de oxigênio representativo foi alcançado utilizando uma concentração celular de 1×10^6 células/mL e um gradiente de pressão ΔP de 290 Pa.

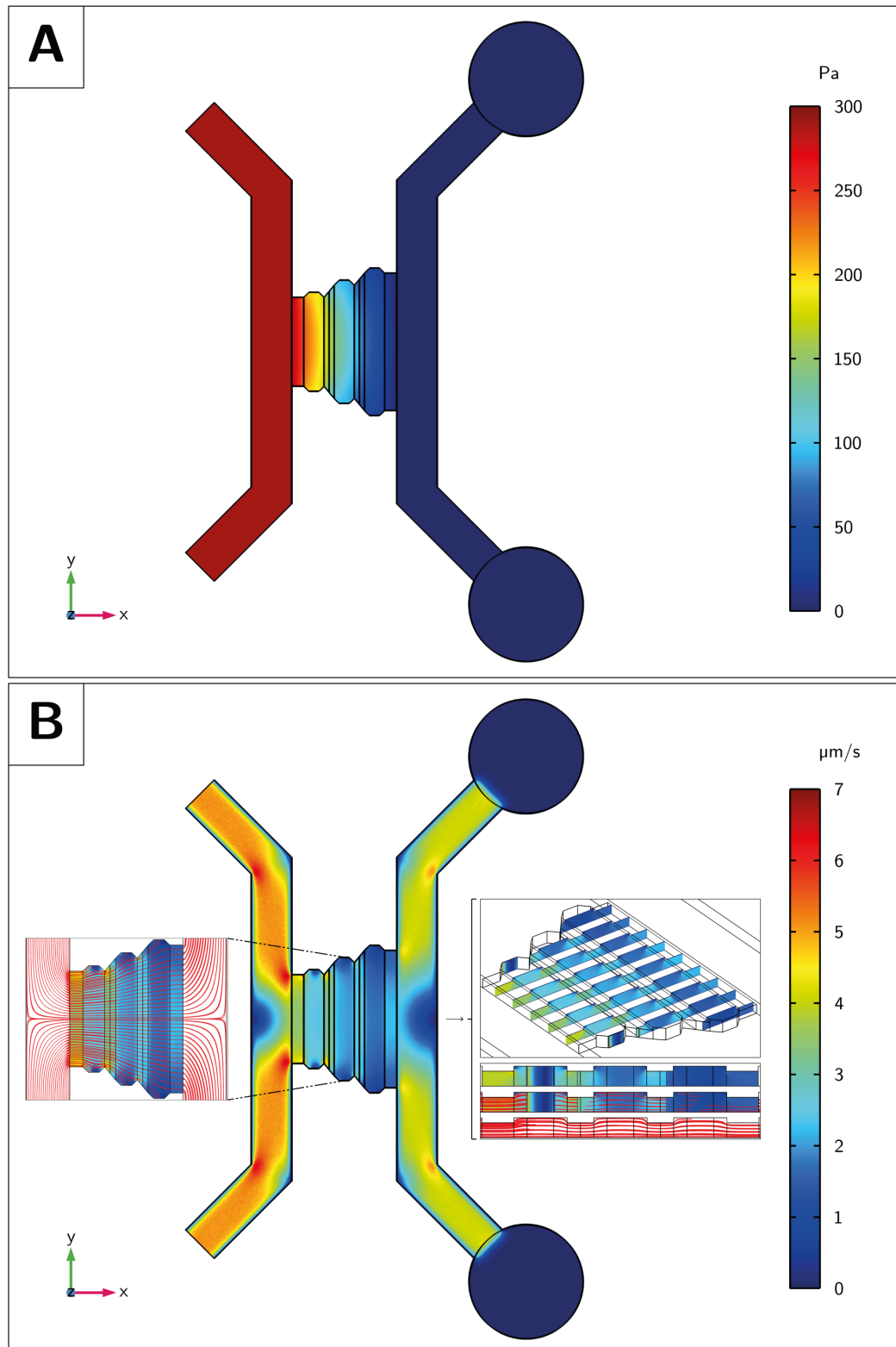
Figura 51 – Distribuição da concentração de oxigênio nos nichos do IMNoC para os primeiros parâmetros de concentração celular e velocidade de escoamento intersticial. Dados para uma linha média em $93,5 \mu\text{m}$ de altura.



Fonte: Autoral.

Na Figura 52, são apresentados os resultados para o campo de pressão e velocidade no microdispositivo IMNoC conforme condições apresentadas na seção de modelagem computacional (Seção 3.4). Descrita pelas equações de Stokes e Brinkman, a evolução espaço-temporal do escoamento é função da queda de pressão linear através do gel de colágeno (Figura 52A). Com uma pressão constante na entrada de 290 Pa e na saída de 0 Pa, o escoamento do fluido pela matriz 3D permanece independente do tempo, sendo a distribuição espacial da velocidade o aspecto mais importante dessa variável (Figura 52B). Em relação ao campo de velocidades, as linhas de corrente no plano x - y mostram um escoamento simétrico e bem comportado ao longo de todos os compartimentos de cultura. Quantitativamente, na Figura 53, é apresentada a distribuição de velocidades em três regiões do IMNoC. É possível verificar um aumento da velocidade nas portas de contenção, com maiores valores para as regiões deslocadas do eixo de simetria, mais próximas das paredes laterais inclinadas do microdispositivo. Essas regiões, em especial a perivascular, apresentaram velocidades próximas das máximas reportadas para uma ótima transmissão de forças extracelulares na malha óssea do corpo humano. Assim, o gradiente de pressão estabelecido pode representar um limite superior para gerar as velocidades requeridas no cultivo.

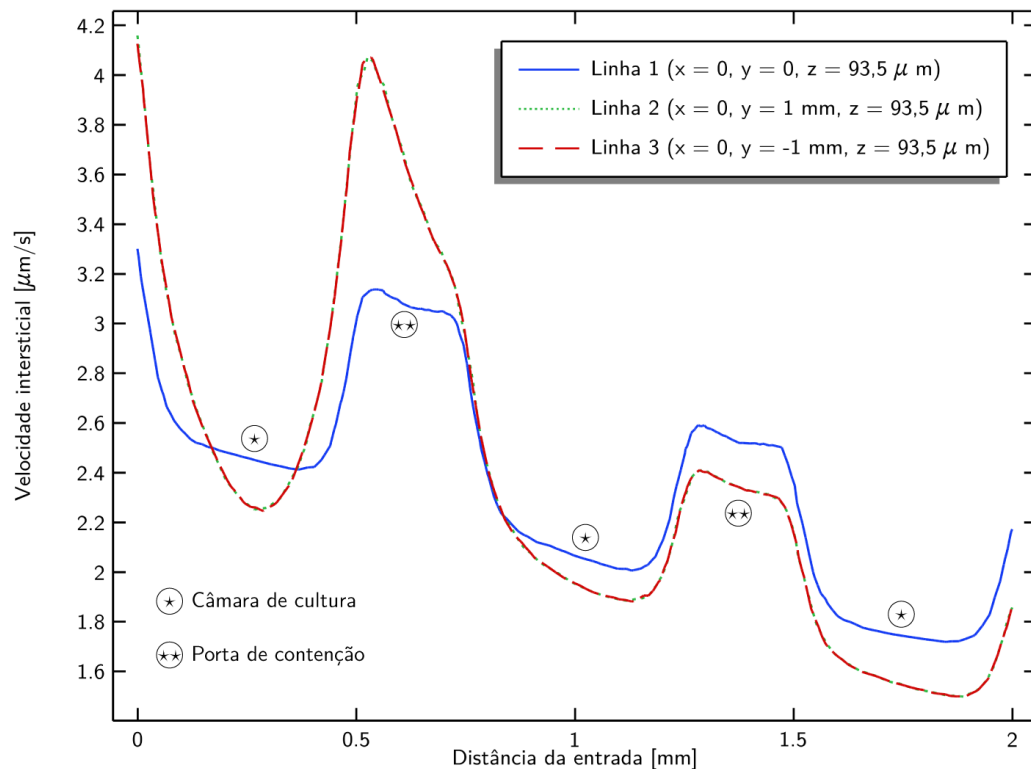
Figura 52 – Análise fluidodinâmica no microdispositivo IMNoC. (A) Gradiente de pressão linear através da matriz de colágeno. (B) Campo de velocidades: distribuição das velocidades no plano x - y , z - x e linhas de corrente.



Fonte: Autoral.

As velocidades nos nichos *in vitro* apresentaram variações ao longo das três diferentes regiões do IMNoC: perivascular, 2,27–2,46 $\mu\text{m/s}$; central, 1,95–2,06 $\mu\text{m/s}$; e endosteal, 1,54–1,74 $\mu\text{m/s}$ (Figura 53). O perfil decrescente das velocidades do escoamento, considerando a entrada no nicho perivascular e a saída no endosteal, é fruto da disposição do sistema biológico, elementos funcionais e posterior soluções de engenharia adotadas para a biomimetização da MO (Figura 24). Basicamente, entender a MEC 3D (compartimentos dos nichos) com uma disposição cilíndrica implica em um aumento contínuo da área de seção com o afastamento do sinusóide (canal fluídico), conseqüentemente resultando em menores velocidades para um mesmo escoamento.

Figura 53 – Velocidade intersticial do escoamento nos compartimento de cultura ao longo do eixo x em três regiões distintas. Linha 1, centralizado no modelo. Linha 2, deslocada para a direita. Linha 3, deslocada para a esquerda.

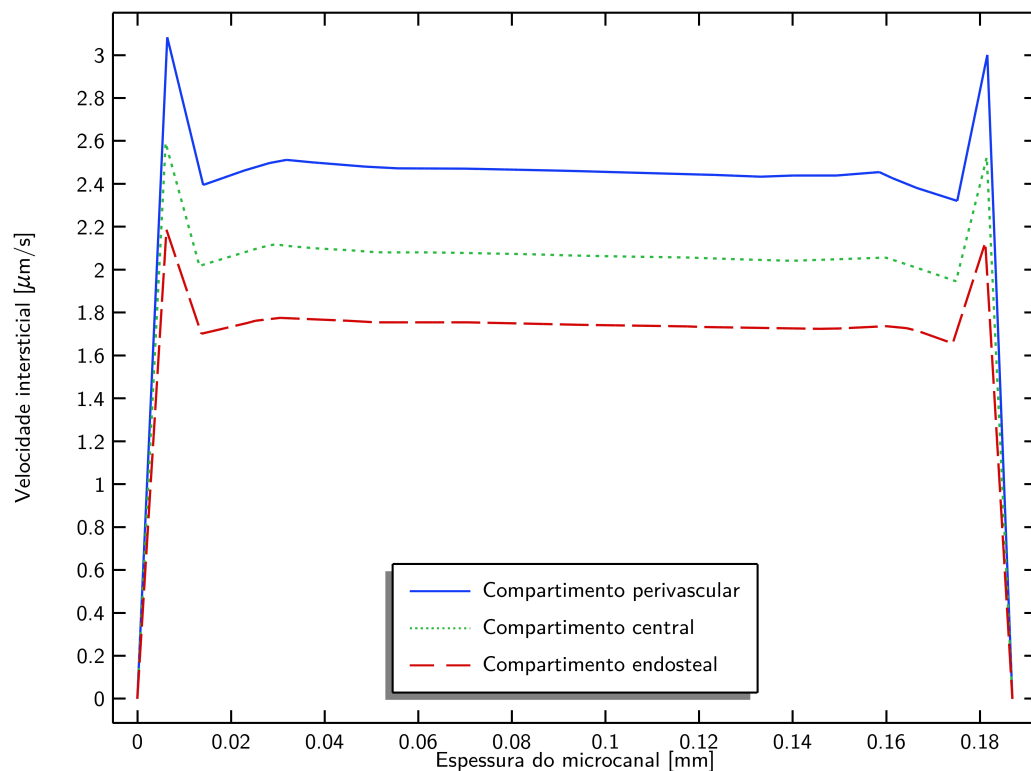


Fonte: Autoral.

O projeto do novo microdispositivo IMNoC foi baseado em uma proposta inovadora para a contenção da matriz de colágeno em compartimento específicos de cultura. Diferentemente das abordagens convencionais, em que o estrangulamento ocorre na horizontal, e por conseguinte o escoamento se mantém simétrico ao longo da espessura dos canais, podendo ser apenas representado por intermédio de um plano médio, a utilização das portas como proposto nesse trabalho requer também uma análise do campo de velocidades ao longo do plano z - x . Na Figura 52B, é reportada que a velocidade ao longo da espessura

se mantém constante para cada ponto nos compartimentos de cultura, com exceção das regiões adjacentes às portas. No mesmo caminho, as linhas de correntes mostram que o escoamento ocorre por todo o microcanal, não sendo detectada nenhuma região de vórtice ou ausência de escoamento, que seriam responsáveis por estimulação não homogênea das células. A fim de corroborar esses resultados, na Figura 54, é apresentada a distribuição de velocidades ao longo de três regiões, cada uma centrada nos respectivos compartimentos perivascular, central e endosteal.

Figura 54 – Velocidade intersticial do escoamento nos compartimento de cultura ao longo do eixo z . Linhas transversais centradas no meio de cada nicho representativo.



Fonte: Autoral.

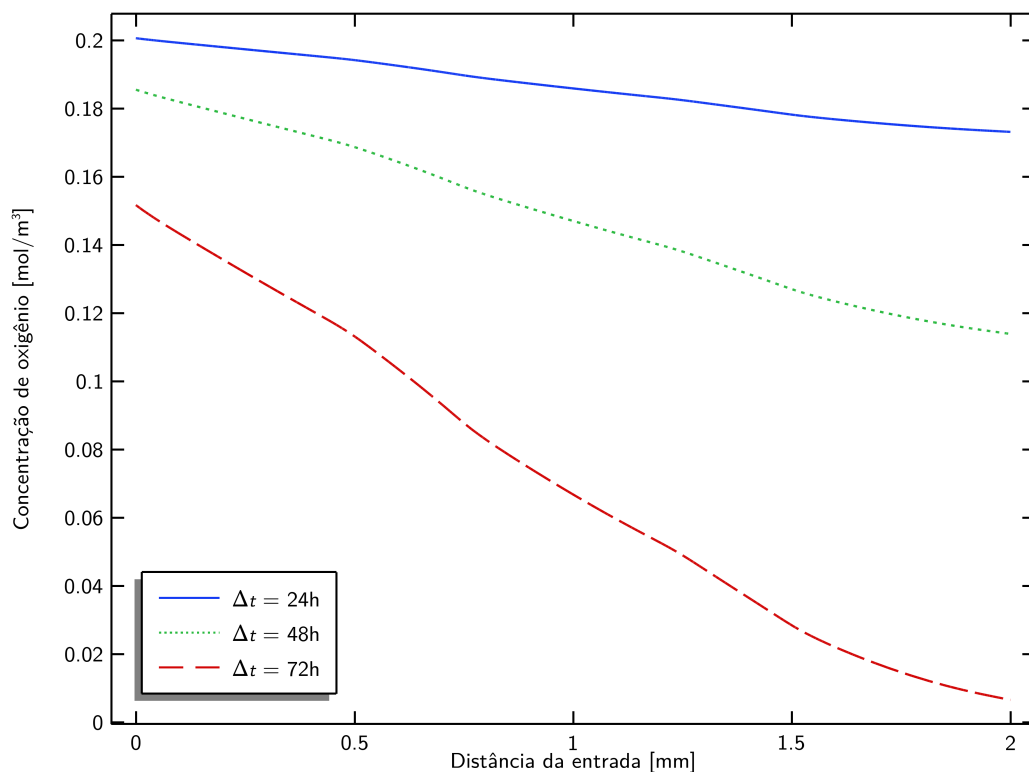
O perfil da distribuição de velocidades é típico para escoamento em meio poroso na condição de baixo número de Darcy ($\kappa/h^2 \approx 10^{-5}$). Para os picos próximos às paredes, onde a velocidade é nula devido à condição de não deslizamento, supõe-se a existência de instabilidades numéricas, que não refletem o escoamento real nos microcanais. Analisando as curvas fica evidente de que as células em uma mesma região no plano $x-y$ são estimuladas com iguais sinalizações mecânicas causadas pelo escoamento, desencadeando nas mesmas repostas de mecanossensação e mecanotransdução celular. Sendo assim, todas as células de cada compartimento formam uma amostra com fenótipos homogêneos estimulados pelos esforços externos. Essas amostras possibilitam o estudo individual e comparativo do comportamento e das funções celulares para cada nicho biomimetizado na plataforma

IMNoC. Além da importância de uma ótima transmissão de forças extracelulares, o escoamento contribui diretamente com a distribuição de solutos nos ambientes de cultura, especificamente o oxigênio.

A equação de transporte de massa para a distribuição de solutos é composta por parcelas difusiva, advectiva, essa devido ao valor do número de Peclet para o presente modelo ($vL/D \approx 1,21$), e parcela relativa ao consumo de oxigênio pela população celular presente no meio. O primeiro resultado relevante do modelo é apresentado a seguir.

Na Figura 55, é mostrada a distribuição de oxigênio nos três dias de experimento para uma condição de concentração celular n inicial de 1×10^6 células/mL e um gradiente de pressão ΔP igual a 290 Pa, o que resulta em uma velocidade de escoamento variando entre 1,54–2,46 $\mu\text{m/s}$.

Figura 55 – Distribuição da concentração de oxigênio nos nichos do IMNoC para os parâmetros ajustados de concentração celular e velocidade de escoamento intersticial. Dados para uma linha média em 93,5 μm de altura.

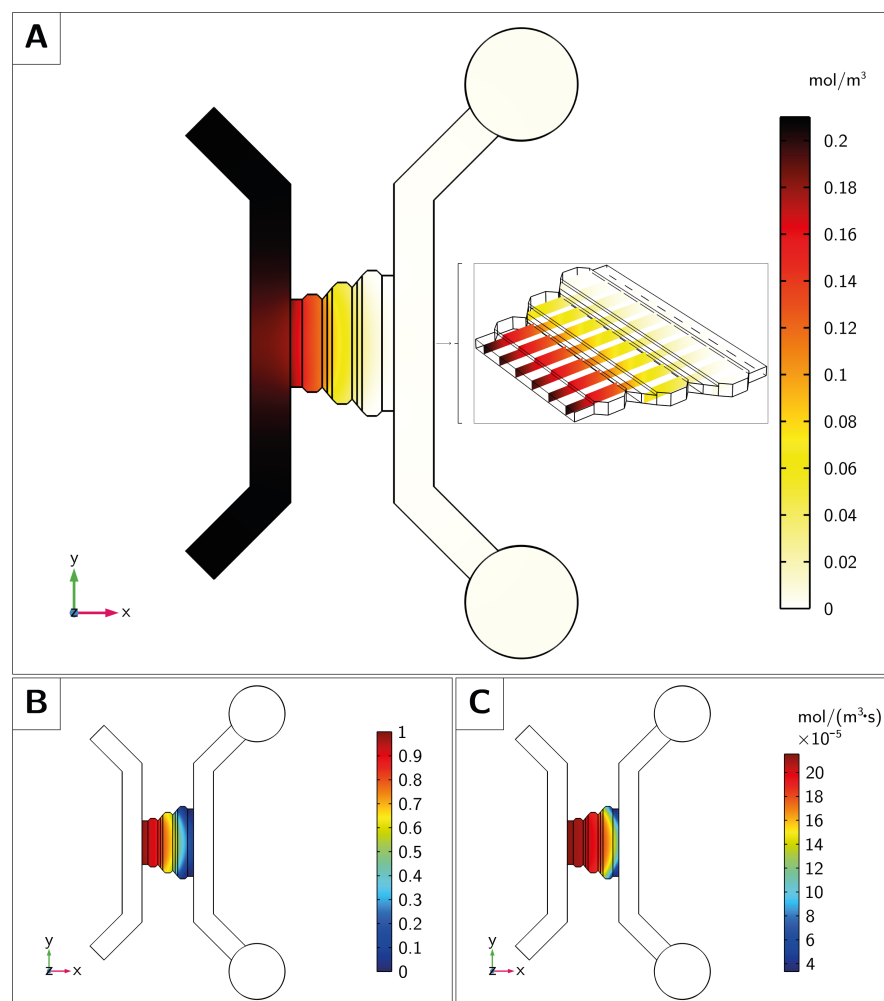


Fonte: Autoral.

A variação temporal e espacial na concentração de oxigênio diluído no meio experimental ao longo do colágeno é função de três parâmetros dependentes entre si: a própria concentração de oxigênio; o consumo de oxigênio; e a concentração celular. O consumo de oxigênio foi implementado como função de um modelo mais elaborado, apresentado aqui como modelo cinético de Michaelis-Mentem (Eq. 2.23), que depende da concentração de

oxigênio e de células, este último quando avaliado em um contexto de população celular. Dois outros modelos são eventualmente considerados (Matellán Martín, 2015), os chamados de reação de ordem zero ($R_{O_2} = R_{max,O_2}$) e primeira ordem ($R_{O_2} = R_{max,O_2}c_{O_2}$), mas ambos ou não representam computacionalmente o real comportamento biológico ou não podem ser utilizados como modelos genéricos para a representação do mesmo fenômeno. Sendo assim, a diminuição na concentração de oxigênio ocorre devido a população celular, que é mediada pela própria concentração e pelo volume do domínio, e pela disposição dos compartimentos, que considerando a entrada de fluido como fonte única de oxigênio, faz com que o soluto seja metabolizado (consumido) continuamente enquanto percorre o gel, diminuindo conseqüentemente a sua concentração no meio enquanto supre as células dos nichos. Na Figura 56, é apresentado um recorte da concentração de oxigênio, concentração celular e o consumo de oxigênio para o último dia de experimento (Figura 56).

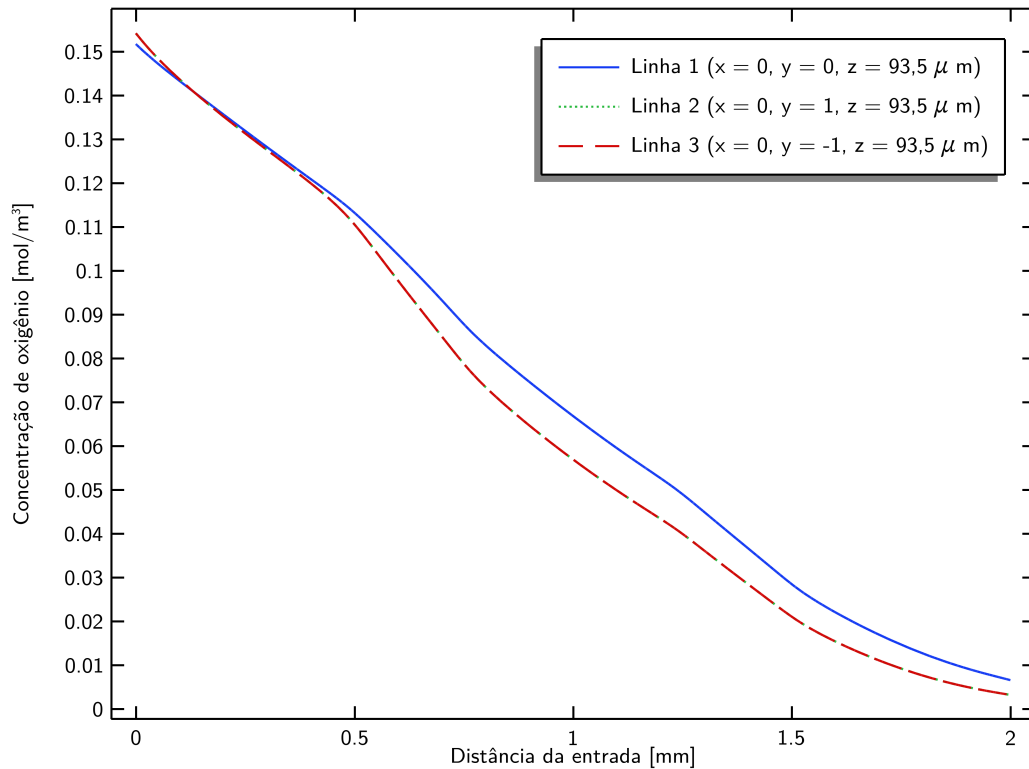
Figura 56 – Análise de transporte de massa e da dinâmica celular no microdispositivo IMNoC. (A) Distribuição da concentração de oxigênio ao longo dos microcanais: planos $x-y$ e $x-z$. (B) Distribuição normalizada da concentração celular nos compartimento de cultura. (C) Distribuição do consumo de oxigênio como função das células nos compartimento de cultura.



Fonte: Autoral.

Os resultados das simulações computacionais para o último dia de experimento indicam um perfil linear decrescente da concentração de oxigênio para todos caminhos horizontais no plano x - y , conforme reportado para uma linha média na Figura 55. De modo complementar, considerando a espessura dos microcanais, a concentração de oxigênio não variou ao longo do eixo z , para uma mesma posição no plano x e y , nos compartimentos de cultura (Figura 56A). O caráter uniforme na distribuição do oxigênio é consequência do escoamento laminar no meio poroso e também do decaimento linear da concentração das células no substrato. Na Figura 56B, é reportada uma maior concentração de células na região de maior disponibilidade de oxigênio, e, conseqüentemente, um maior consumo de oxigênio (Figura 56C). A mesma equivalência é detectada para a região de menor concentração celular, disponibilidade de oxigênio e o consumo. Sendo essas curvas geradas por meio de um sistema não-linear acoplado de equações dinâmicas, os resultados para o consumo de oxigênio indicam que, com os parâmetros biológicos e as condições iniciais e de contorno selecionados, o modelo *in silico* é capaz de prever com resultados coerentes a evolução das variáveis de estudo. No trabalho de Marturano-Kruik et al. (2018) é reportado um consumo mínimo e máximo de aproximadamente 1 e 3,8 mol/m³s, respectivamente, convergindo completamente aos resultados obtidos com o modelo proposto aqui (Figura 56C), considerando uma região central dos compartimento de cultura (1,48–2,12 mol/m³s). Como a velocidade intersticial e a concentração de oxigênio são duas variáveis fundamentais para a biomimetização *in vitro* de um microambiente fidedigno da MO, uma análise quantitativa da distribuição do oxigênio é relevante para entender como o IMNoC emula exatamente esse comportamento.

Conforme apresentado na Figura 57, a distribuição de oxigênio no gel de colágeno teve um comportamento similar à uma curva linear decrescente para três regiões distintas, indicando um fornecimento homogêneo da substância para as células. A maior concentração de oxigênio, detectada na entrada dos compartimentos, foi de 0,154 mol/m³ (p_{O_2} 15,4 %), especificamente o nicho perivascular, enquanto a menor foi detectada na saída e equivalente à 0,01 mol/m³ (p_{O_2} 1 %), relativo ao nicho endosteal. Logo, para a velocidade intersticial gerada por meio de uma gradiente de pressão de 290 Pa, a concentração de oxigênio apresentou uma queda de aproximadamente 94%. Esses valores são corroborados no já citado trabalho de Marturano-Kruik et al. (2018), que propuseram um microdispositivo do tipo OoC, com escoamento intersticial e gradientes de oxigênio, capaz de mediar a formação de vasos sanguíneos, pela diferenciação estimulada das células endoteliais, e o crescimento de células cancerígenas.

Figura 57 – Consumo de oxigênio pela concentração celular no microdispositivo IMNoC.

Fonte: Autoral.

Apesar do sucesso em simular computacionalmente alguns aspectos fisiológicos do microambiente da MO, a proposta inicial de concentração celular e gradiente de pressão (velocidade intersticial) precisou ser modificada, conforme apresentado no início da dessa seção. Especificamente, não foi possível gerar um gradiente de oxigênio fisiológico utilizando uma velocidade intersticial na ordem de $10^{-1} \mu\text{m/s}$, característica da MO (Dafni et al., 2002). Nesse cenário, futuros desenvolvimentos utilizando a plataforma IMNoC podem ser pautados na modificação do projeto dos microcanais. Como explicitado, a equação que descreve o transporte do oxigênio é composta por três parcelas: difusiva, advectiva e fonte/sumidouro. Visando se trabalhar com escoamentos gerados por um gradiente de pressão na ordem de decapascal, e considerando que a difusão pode ser representada em unidades de velocidade e comprimento ($\text{m}^2/\text{s} = (\text{m/s})\text{m}$), o redimensionamento dos compartimentos de cultura celular é uma primeira abordagem para esse fim. Por exemplo, na geometria do IMNoC, os compartimentos foram projetados com a mesma largura ($500 \mu\text{m}$). Nesse cenário, na competição entre a velocidade do transporte por difusão e advecção e o fluxo do sumidouro de oxigênio, o consumo foi maior, impedindo a criação do gradiente requerido. Entretanto, sabe-se que os nichos da medula óssea apresentam um tamanho na ordem de aproximadamente $100 \mu\text{m}$, o que na plataforma IMNoC poderia equilibrar essa competição entre as parcelas de transporte, fluidodinâmica e biológica,

desenvolvendo-se assim um modelo computacional que seja cada vez mais congruente com as dimensões *in vivo* de órgãos e sítios de órgãos. Isso resultará em uma plataforma IMNoC com melhor potencial para o estudo do comportamento das células de nicho da MO em condições típicas.

No contexto da MO, a biomimetização do fluxo intersticial, e principalmente do transporte de oxigênio ao longo do volume do órgão, é de fundamental importância para entender a dinâmica hematopoiética e, em específico, a leucêmica. Estudos mostram que as células leucêmicas sobrevivem e se adaptam ao ambiente de hipóxia por intermédio de alguns caminhos específicos, como por exemplo a mudança no metabolismo, surgindo assim o desenvolvimento de novos tratamentos baseados no conceito de redirecionamento metabólico em células cancerígenas (Goto et al., 2014). A representação do microambiente nativo leucêmico da medula óssea (Seção 2.1.3) possibilitará então uma melhor compreensão do comportamento sistêmico das células leucêmicas, contribuindo com a evolução da ciência e, principalmente, com o aprimoramento das estratégias terapêuticas atualmente utilizadas.

4.6.1 Limitações do modelo

A modelagem da complexidade de MO em uma plataforma microfisiológica, que integre transporte de massa, fluidodinâmica e dinâmica celular, requer, e possibilita, algumas simplificações, desde que não prejudiquem o caráter preditivo da implementação. As considerações nesse trabalho de tese estão apresentadas abaixo:

- [1] O fluido intersticial é newtoniano com viscosidade μ e densidade ρ constante.
- [2] O escoamento intersticial é implementado pelas equações de Stokes.
- [3] A permeabilidade κ do colágeno tipo I é considerada uniforme e isotrópica.
- [4] A parede do IMNoC, constituída por PDMS, está em condição de isolamento.
- [5] A difusão de oxigênio D_{O_2} é isotrópica, uniforme e constante.

A primeira consideração se aplica porque o fluido intersticial é essencialmente comparado ao plasma, componente sanguíneo formado por 90% de água e por substâncias dissolvidas tais como proteínas, lipídios, sais, entre outras. Desde que a maior porcentagem da composição seja água, e que a água é um fluido newtoniano com viscosidade e densidade constantes para temperaturas constantes, essa suposição é válida.

A consideração [2] é justificada pelo baixo número de Reynolds no qual o regime ocorre, especificamente, na ordem de 10^{-7} . Um escoamento nessas condições é dominado pela parcela viscosa, chamado de escoamento rastejante ou de Stokes.

As hipóteses [3] e [5] se justificam por causa da suposição de densidade celular e uma estrutura da matriz de hidrogel de colágeno homogêneas. Considerando o modelo proposto nessa tese, com a MEC formada apenas por um tipo de proteína e cultivada apenas com um tipo celular, essas suposições são válidas. Entretanto, o microambiente da MO *in vivo* é formado por diversos tipos celulares, com tamanhos variados e que remodelam a matriz pela degradação e formação das novas fibras, podendo alterar a sua permeabilidade e conseqüentemente a difusão de oxigênio. Além disso, há outros componentes que formam a MEC, como por exemplo o colágeno tipo IV, fibronectina e laminina, que desempenham papel vital na formação da malha tridimensional. A incorporação dessas características será um avanço no desenvolvimento do modelo computacional da IMNoC.

Por fim, a consideração [4] diz respeito às condições experimentais nas quais o estudo foi inicialmente proposto. Entretanto, modelos que considerem o transporte de oxigênio ao longo do PDMS podem representar algum aspecto diferente em relação à distribuição de oxigênio e à dinâmica celular nos compartimentos de cultura.

O modelo computacional do IMNoC oferece uma primeira perspectiva acerca da ferramenta desenvolvida e, mesmo com as simplificações, pode se consolidar como o passo inicial para entender o funcionamento do microdispositivo e as predições por ele realizadas.

5 Conclusões e Perspectivas Futuras

5.1 Conclusões

Nesta tese, nós apresentamos as etapas de concepção, modelagem física e computacional, microfabricação, avaliação e simulação para o desenvolvimento do dispositivo microfisiológico IMNoC.

Na primeira etapa, a inspiração para o desenvolvimento do IMNoC veio da concepção de uma MO simplificada, constituída de alguns componentes fundamentais. Neste estudo, foi projetada a geometria de um dispositivo microfluídico composto por uma região de cultura tridimensional, particionada em três câmaras interligadas, com dimensões de $187 \mu\text{m}$ de altura e $500 \mu\text{m}$ de largura, representando os três nichos da medula óssea humana. Cada uma dessas três câmaras de cultura representa os nichos perivascular, central e endosteal da MO, respectivamente. O aspecto principal dessas câmaras de cultura é que os três nichos formam um contínuo físico, permitindo a migração celular e as interações célula-célula sem nenhuma barreira que dificulte esses processos. Canais fluídicos microvasculares, com altura de $187 \mu\text{m}$ largura de $1000 \mu\text{m}$, foram incorporados para biomimetizar os sinusóides que fornecem toda sorte de componentes vitais para as células de nicho da MO, especialmente os fatores de crescimento liberados por outras células e o oxigênio carregado pelo fluido intersticial, também desempenhando a função de renovação/limpeza do microambiente celular, retirando os resíduos produzidos pelo metabolismo das células. Além disso, esses microcanais permitem o escoamento do fluido intersticial ao longo do microambiente da MO, estimulando mecânica e fisicamente as células por meio da velocidade e das tensões de associadas ao fluxo. Sendo assim, foi possível projetar uma geometria para o IMNoC inspirada pela natureza da MO, biomimetizando aspectos importantes da fisiologia da MO, especificamente os fenômenos de transporte, a dinâmica celular e a estrutura tridimensional do microambiente dos seus nichos.

Após a concepção do projeto do IMNoC, a próxima etapa foi a de microfabricação e montagem do IMNoC, baseadas nas técnicas convencionais de microfluídica, que incluem a fotolitografia, moldagem e o plasma de oxigênio. Entretanto, o protocolo completo apresenta um método alternativo inovador para a confecção dos padrões. Nesse presente trabalho, nós utilizamos a manufatura aditiva, especificamente a impressão 3D em resina acrílica, para a fabricação dos moldes. A escolha desse método foi pautada por uma das principais características projetadas para a geometria do IMNoC: a necessidade de se construir câmaras de cultura adjacentes que permitissem operações de inserção de soluções independentes entre elas, mas que ao final do processo formassem um substrato ininterrupto e sem obstruções. O protocolo estabelecido para a manufatura aditiva do

IMNoC por impressão 3D baseada em resina acrílica apresentou resultados que mostram a possibilidade de microfabricar um dispositivo microfisiológico com as dimensões e geometrias requeridas utilizando o método de impressão 3D em resina acrílica. Contudo, devido ao caráter inovador do protocolo no que diz respeito à utilização da impressão 3D baseada em resina acrílica, duas análises precisaram ser realizadas.

A primeira análise diz respeito a avaliação da geometria do modelo físico do IMNoC, procurando por entender qual o nível de réplica das dimensões de projeto por meio da impressão 3D e motivada pela resolução das impressoras atuais, que podem resultar em uma geometria divergente à projetada inicialmente quando se trabalha com dimensões micrométricas. Os resultados indicam que com o protocolo estabelecido foi possível imprimir um modelo físico com as dimensões no plano xy análogas às de projeto. Por outro lado, devido aos resultados obtidos para as dimensões na direção da altura dos microcanais (eixo z), além do perfil impresso das lombadas, se fez necessário e readequar a geometria do modelo computacional para essa nova situação. A altura dos canais mudou de $200 \mu\text{m}$ para $187 \mu\text{m}$, a profundidade das depressões de $60 \mu\text{m}$ para $47 \mu\text{m}$ e o perfil das lombadas não foi circular, mas retangular.

A segunda análise está relacionada ao ensaio de citotoxicidade do PDMS moldado nos moldes 3D de resina acrílica, pois está reportado na literatura que a presença de monômeros e fotoiniciadores na superfície do molde mestre podem inibir a cura do PDMS, e quando células são cultivadas em microdispositivos feitos com esse tipo de material “contaminado” se detecta uma alta taxa de morte celular. Os resultados preliminares indicaram uma viabilidade celular de 76 % quando o cultivo correu na presença da amostra do PDMS. Esse valor é maior do que a porcentagem definida pela norma para a definição de um meio não citotóxico. Entretanto, o método utilizado representa mais uma análise qualitativa do que quantitativa do comportamento celular, sendo necessária a realização de outros testes mais elaborados para uma verificação mais completa acerca da não citotoxicidade do novo material fabricado.

Avalizando as duas análises, as conclusões aqui indicam o desenvolvimento de um método que possibilita a impressão de moldes 3D e, conseqüentemente, microdispositivos biocompatíveis, aplicada à manufatura dos OoCs para a biomimetização da MO com reprodutibilidade e em larga escala, por meio do uso de protocolos que buscam as melhores práticas científicas e visam otimizar todos os processos, reduzindo assim os erros humanos.

Apesar de algumas limitações serem identificadas com a utilização da impressão 3D, como por exemplo a qualidade da superfície e a resolução das estruturas, e por se tratar de uma técnica incipiente, requerendo estudos sistemáticos sobre moldagem, biocompatibilidade, citotoxicidade e dimensionalidade, a impressão 3D aplicada, quando comparada às alternativas convencionais, é um método simples e eficiente em relação ao custo e ao tempo, além de apresentar vantagens que incluem a liberdade de se construir

estruturas complexas, por exemplo geometrias como malhas da matriz óssea ou redes de vasos circulares, e a flexibilidade nas dimensões do projeto.

Finalizado o estudo sobre as dimensões do IMNoC impresso e o ensaio citotóxico no PDMS utilizado com material base, nesta etapa realizou-se uma prova de conceito com o microdispositivo IMNoC para a biomimetização da MO. O estudo foi elaborado por meio de uma com monocultura estática de células representativas da LLA na MO em uma matriz 3D de hidrogel colágeno tipo I de cauda de rato 2 mg/mL. Efetuado em caráter preliminar, o experimento indica que o IMNoC forneceu às células condições básicas para a manutenção de uma cultura tridimensional e contínua de curto prazo com resposta como no corpo, desde que a representação fenotípica semelhante ao *in vivo* indique um comportamento como em órgãos e tecidos humanos. Mesmo considerando que os resultados foram obtidos para um modelo biológico muito simplificado da fisiologia da MO, a plataforma IMNoC apresentou indícios substanciais de que é capaz de se tornar uma plataforma importante para a investigação de fenômenos celulares *in vitro*.

Previamente a implementação do modelo computacional, para o desenvolvimento de um modelo que represente as condições experimentais definidas para o estudo, a caracterização de algumas propriedades estruturais, e por conseguinte hidráulicas, foi incorporada à presente tese. Nesse modelo representativo da MO, a biomimetização da MEC no IMNoC foi realizada utilizando um colágeno tipo I de cauda de rato com densidade de 4 mg/mL, que apresenta propriedades mecânicas, especificamente o módulo de elasticidade, análogo ao reportado para o nicho menos rígido da MO, o central. Assim, uma cultura realizada nesse ambiente forneceria às células sinais que desencadeariam respostas, como *in vivo*, relativas aos sistemas mecano-sensoriais e -responsivos. O resultados reportam que para esse hidrogel, a porosidade, diâmetro dos poros e das fibras configuram um microambiente com as mesmas características presentes em regiões do corpo humano, indicativo de uma configuração de cultura concreta e assertiva para uma biomimetização da MO no microdispositivo IMNoC.

Por fim, com a obtenção das propriedades hidráulicas da MEC e com os parâmetros reportados na literatura, a construção da geometria do IMNoC foi guiada por um modelo matemático de fenômenos de transporte que implementou a hidrodinâmica e o comportamento das células em um conjunto de equações matemáticas. O modelo matemático concebido nesta presente tese, apesar das simplificações, nos forneceu uma ferramenta descritiva aguçada para o prognóstico de algumas características e fenômenos observados *in vivo*. O fluxo intersticial entre as câmaras de cultura variou entre 1,54–2,46 $\mu\text{m/s}$, ambos valores dentro do intervalo fisiológico para a MO e para o fluido intersticial (0,1–5,0 $\mu\text{m/s}$). O gradiente de oxigênio ao longo do dispositivo foi representado por um máximo no nicho perivascular de 0,154 mol/m³ e um mínimo no nicho endosteal de 0,01 mol/m³. Esses valores preditos recapitulam em cada nicho a fisiologia da MO: desde a magnitude

da velocidade do escoamento, e conseqüentemente das tensões fluidodinâmicas, até a quantificação da queda gradual de oxigênio e do seu consumo pelas células, função das concentrações de ambos, replicam às condições que as células experimentam/desempenham *in vivo*. O modelo computacional implementado possibilita a predição de condições nas plataformas *in vitro* que colaboram com diversos fenômenos biológicos, como por exemplo a preservação das células leucêmicas em seus nichos especializados. Sendo assim, esses modelos computacionais são imprescindíveis nesta emergente área da ciência que incorpora em um chip a cultura de células *in vitro* e sistemas dinâmicos para desenvolvimento das frentes biomédicas que tratam da triagem de fármacos e do estudo de patologias importantes na MO.

Concluindo, a bioengenharia microfluídica desenvolvida para o projeto do IMNoC tornou possível a criação de uma plataforma que traz a perspectiva de fornecer condições para o desenvolvimento de pesquisas significativas sobre a medula e seus principais componentes, seus processos fundamentais, fisiológicos e/ou patológicos, e como eles evoluem interativamente no corpo humano. Baseado nas técnicas de microfabricação e engenharia biológica, o IMNoC surge como uma plataforma em um campo expoente que vem revolucionando a biomimetização da real complexidade da MO e de tecidos e órgãos do corpo humano *in vitro*.

5.2 Perspectivas Futuras

Baseado no trabalho apresentado e nos resultados obtidos nesta tese, as evidentes mínimas representações das culturas *in vitro* e a necessidade de verificações experimentais do modelo *in silico* governam as perspectivas futuras dessa pesquisa.

Como reportado nesse trabalho, a MO é um órgão extremamente complexo, formado por uma abundância de componentes biofísicos e químicos naturalmente diversos. Esses componentes formam uma rede integrada de interações mecânicas e biológicas que governam todo o comportamento e o destino das células que compõe os nichos da MO. Na simplificada representação que utilizamos para a biomimetização do órgão na IMNoC, utilizamos apenas um tipo de constituinte para a MEC (colágeno tipo I 2 mg/mL) e um tipo celular representativo da MO patológica (células Jy). Nesse cenário, a construção de uma cultura *in vitro* mais completa se faz necessária para uma representação mais fiel do microambiente *in vivo* que as células de interesse da MO habitam. Por exemplo, se utilizando do projeto do IMNoC, a distinção operacional das câmaras que representam os nichos torna possível a realização de uma cultura com as seguintes configurações: tridimensional no nicho central, com uma solução de CTH/CTLs e CTMs e colágeno 2 mg/mL (módulo de elasticidade ≈ 300 Pa); tridimensional no nicho perivascular, com um solução de CTH/CTLs, CTMs e CEs e colágeno 4 mg/mL (módulo de elasticidade ≈ 1200 Pa); e bidimensional no

nicho endosteal, com os OBs cultivados na base do IMNoC revestida por uma solução de proteínas (*e. g.* colágeno e fibronectina), sob uma camada de hidrogel cultivada com células CTH/CTLs e CTMs que termine de compor o nicho. Esse passo é capital para uma otimização das análises e dos resultados obtidos pela plataforma IMNoC.

O segundo vetor diretor está dividido em dois pontos de vista. O primeiro diz respeito ao modelo como uma ferramenta computacional propriamente dita. Para isso, é necessário verificar se a sua implementação está correta, possibilitando aplicações em problemas genéricos e/ou específicos que visem mimetizar a medula óssea *in silico*. Sob o ponto de vista da engenharia dos fenômenos de transporte, embora o modelo computacional implementado se configure como um primeiro passo para a recapitulação da MO em um microdispositivo biomimético, a verificação das variáveis principais, escoamento do fluido e os níveis de oxigênio, é inegociável para a apresentação de uma ferramenta OoC com alto poder preditivo. Os caminhos traçados para essa etapa já estão em fase de protocolização seguindo trabalhos de referências. A velocidade intersticial será validada aplicando-se o método de recuperação da fluorescência após exposição a luz (FRAP - *Fluorescence Recovery After Photobleaching*). Para tal, será utilizado microscópio confocal de escaneamento e o composto fluorescente do tipo Dextran/Fitc-dextran 70 kDa. A distribuição do oxigênio será validada utilizando-se um marcador de hipóxia celular (*e. g.* Image-iTTM Red Hypoxia Reagent; H10498, ThermoFisher) que quantifica concentrações entre 1–20%. A padronização ocorrerá em ambiente controlados em normóxia e apóxia.

Referências

- Akhmanova, M., Osidak, E., Domogatsky, S., Rodin, S., and Domogatskaya, A. (2015). Physical, Spatial, and Molecular Aspects of Extracellular Matrix of In Vivo Niches and Artificial Scaffolds Relevant to Stem Cells Research. *Stem Cells International*, 2015:1–35.
- Aleman, J., George, S. K., Herberg, S., Devarasetty, M., Porada, C. D., Skardal, A., and Almeida-Porada, G. (2019). Deconstructed Microfluidic Bone Marrow On-A-Chip to Study Normal and Malignant Hemopoietic Cell–Niche Interactions. *Small*, 15(43):1–13.
- Amin, R., Knowlton, S., Hart, A., Yenilmez, B., Ghaderinezhad, F., Katebifar, S., Messina, M., Khademhosseini, A., and Tasoglu, S. (2016). 3D-printed microfluidic devices. *Biofabrication*, 8(2):1–16.
- Ando, J., Nomura, H., and Kamiya, A. (1987). The effect of fluid shear stress on the migration and proliferation of cultured endothelial cells. *Microvascular Research*, 33(1):62–70.
- Antoine, E. E., Vlachos, P. P., and Rylander, M. N. (2014). Review of collagen i hydrogels for bioengineered tissue microenvironments: Characterization of mechanics, structure, and transport. *Tissue Engineering - Part B: Reviews*, 20(6):683–696.
- Antoine, E. E., Vlachos, P. P., and Rylander, M. N. (2015). Tunable collagen I hydrogels for engineered physiological tissue micro-environments. *PLoS ONE*, 10(3):1–18.
- Antoni, D., Burckel, H., Josset, E., and Noel, G. (2015). Three-dimensional cell culture: a breakthrough in vivo. *International journal of molecular sciences*, 16(3):5517–5527.
- Argentati, C., Morena, F., Tortorella, I., Bazzucchi, M., Porcellati, S., Emiliani, C., and Martino, S. (2019). Insight into Mechanobiology : How Stem Cells Feel Mechanical Forces and Orchestrate Biological Functions. *International Journal of Molecular Sciences*, 20:5337.
- Aziz, A. U. R., Geng, C., Fu, M., Yu, X., Qin, K., and Liu, B. (2017). The role of microfluidics for organ on chip simulations. *Bioengineering*, 4(2):39.
- Azizpour, N., Avazpour, R., Rosenzweig, D. H., Sawan, M., and Ajji, A. (2020). Evolution of biochip technology: A review from lab-on-a-chip to organ-on-a-chip. *Micromachines*, 11(6):1–15.
- Bai, J. and Wang, C. (2020). Organoids and Microphysiological Systems: New Tools for Ophthalmic Drug Discovery. *Frontiers in Pharmacology*, 11(407):1–7.

- Baker, B. M. and Chen, C. S. (2012). Deconstructing the third dimension-how 3D culture microenvironments alter cellular cues. *Journal of Cell Science*, 125(13):3015–3024.
- Bartl, R. (2013). Histology of Normal Bone and Bone Marrow, and Their Main Disorders. In *Magnetic resonance imaging of the bone marrow*, pages 3–20. Springer Berlin Heidelberg, Berlin.
- Bartl, R., Frisch, B., and Burkhardt, R. (1982). *III. Structure and Function of the Normal Bone Marrow*. Karger Publishers.
- Bártolo, P. J. (2011). *Stereolithography: materials, processes and applications*. Springer Science & Business Media.
- Bear, J. (2018). *Modeling Phenomena of Flow and Transport in Porous Media*. Cham: Springer International Publishing.
- Bear, J. and Corapcioglu, M. Y. (2012). *Fundamentals of Transport Phenomena in Porous Media*, volume 82. Springer Science & Business Media.
- Becker, H. and Gärtner, C. (2008). Polymer microfabrication technologies for microfluidic systems. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 390(1):89–111.
- Beebe, D. J., Mensing, G. A., and Walker, G. M. (2002). Physics and applications of microfluidics in biology. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 4:261–286.
- Bein, A., Shin, W., Jalili-Firoozinezhad, S., Park, M. H., Sontheimer-Phelps, A., Tovaglieri, A., Chalkiadaki, A., Kim, H. J., and Ingber, D. E. (2018). Microfluidic Organ-on-a-Chip Models of Human Intestine. *Cmgh*, 5(4):659–668.
- Bello, A. B., Park, H., and Lee, S.-H. (2018). Current approaches in biomaterial-based hematopoietic stem cell niches. *Acta Biomaterialia*, 72:1–15.
- Belyavsky, A. V. (2019). Niches of Hematopoietic Stem Cells in Bone Marrow. *Molecular Biology*, 53(6):889–895.
- Ben-Naim, A. Y. (1980). *Hydrophobic interactions*. Springer Science & Business Media.
- Berthier, E., Young, E. W., and Beebe, D. (2012). Engineers are from PDMS-land, biologists are from polystyrenia. *Lab on a Chip*, 12(7):1224–1237.
- Bhatia, S. N. and Ingber, D. E. (2014). Microfluidic organs-on-chips. *Nature Biotechnology*, 32(8):760–772.
- Billmeyer, F. W. (1984). *Textbook of Polymer Science*. John Wiley & Sons.
- Birbrair, A., Frenette, P. S., and Biology, C. (2016). Niche heterogeneity in the bone marrow. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1370(1):82–96.

- Bodas, D. and Khan-Malek, C. (2007). Hydrophilization and hydrophobic recovery of PDMS by oxygen plasma and chemical treatment-An SEM investigation. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 123(1):368–373.
- Bonyár, A., Sántha, H., Ring, B., Varga, M., Kovács, J. G., and Harsányi, G. (2010). 3D Rapid Prototyping Technology (RPT) as a powerful tool in microfluidic development. *Procedia Engineering*, 5:291–294.
- Borók, A., Laboda, K., and Bonyár, A. (2021). PDMS bonding technologies for microfluidic applications: A review. *Biosensors*, 11(8).
- Braham, M. V., Ahlfeld, T., Akkineni, A. R., Minnema, M. C., Dhert, W. J., Öner, F. C., Robin, C., Lode, A., Gelinsky, M., and Alblas, J. (2018). Endosteal and Perivascular Subniches in a 3D Bone Marrow Model for Multiple Myeloma. *Tissue Engineering - Part C: Methods*, 24(5):300–312.
- Breslin, S. and O’Driscoll, L. (2013). Three-dimensional cell culture: The missing link in drug discovery. *Drug Discovery Today*, 18(5-6):240–249.
- Brinkman, H. C. (1947). A calculation of the viscous force exerted by a flowing fluid on a dense swarm of particles. *Applied Scientific Research Section a-Mechanics Heat Chemical Engineering Mathematical Methods*, 1(1):27–34.
- Brittain, S., Paul, K., Zhao, X.-m., and Whitesides, G. (1998). Soft lithography and microfabrication. *Physics World*, 11(5):31.
- Bruce, A., Evans, R., Mezan, R., Shi, L., Moses, B. S., Martin, K. H., Gibson, L. F., and Yang, Y. (2015). Three-dimensional microfluidic tri-culture model of the bone marrow microenvironment for study of acute lymphoblastic leukemia. *PLoS ONE*, 10(10):1–16.
- Brugarolas, L. G. R. (2016). *Organ-on-a-chip microfluidic devices mimicking human splenic functions*. PhD thesis, Universitat de Barcelona Departament.
- Bruus, H. (2008). *Theoretical Microfluids*. Oxford: Oxford university press.
- Buchwald, P. (2009). FEM-based oxygen consumption and cell viability models for avascular pancreatic islets. *Theoretical Biology and Medical Modelling*, 6(1).
- Buxboim, A., Rajagopal, K., Brown, A. E., and Discher, D. E. (2010). How deeply cells feel: Methods for thin gels. *Journal of Physics Condensed Matter*, 22(19):194116.
- Buzek, J. and Ask, B. (2009). Regulation (ec) no 1223/2009 of the european parliament and of the council of 30 november 2009 on cosmetic products. *Official Journal of the European Union L*, 342.

- Byun, C. K., Abi-Samra, K., Cho, Y. K., and Takayama, S. (2014). Pumps for microfluidic cell culture. *Electrophoresis*, 35(2-3):245–257.
- Callister, W. D. J. and Rethwisch, D. G. (2014). *Materials science and engineering: An Introduction*. New York: Wiley.
- Calvi, L. M., Adams, G. B., Weibrecht, K. W., Weber, J. M., Olson, D. P., Knight, M. C., Martin, R. P., Schipani, E., Divieti, P., and Bringhurst, F. R. (2003). Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature*, 425(6960):841–846.
- Carrion, B., Huang, C. P. P., Ghajar, C. M. M., Kachgal, S., Kniazeva, E., Jeon, N. L. L., and Putnam, A. J. J. (2010). Recreating the perivascular niche ex vivo using a microfluidic approach. *Biotechnology and Bioengineering*, 107(6):1020–1028.
- Chakraborty, S. (2010). *Microfluidics and Microfabrication*. Springer.
- Chan, C. Y., Huang, P.-H., Guo, F., Ding, X., Kapur, V., Mai, J. D., Yuen, P. K., and Huang, T. J. (2011). Accelerating drug discovery via organs-on-chips Chung. *Lab on a Chip*, 13(24):4697–4710.
- Chapman, E. H., Kurec, A. S., and Davey, F. R. (1981). Cell volumes of normal and malignant mononuclear cells. *Journal of Clinical Pathology*, 34(10):1083–1090.
- Chi, C. W., Ahmed, A. R., Dereli-Korkut, Z., and Wang, S. (2016). Microfluidic cell chips for high-throughput drug screening. *Bioanalysis*, 8(9):921–937.
- Chiarini, F., Lonetti, A., Evangelisti, C., Buontempo, F., Orsini, E., Evangelisti, C., Cappellini, A., Neri, L. M., McCubrey, J. A., and Martelli, A. M. (2016). Advances in understanding the acute lymphoblastic leukemia bone marrow microenvironment: From biology to therapeutic targeting. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1863(3):449–463.
- Chou, D. B., Frismantas, V., Milton, Y., David, R., Pop-Damkov, P., Ferguson, D., MacDonald, A., Vargel Bölükbaşı, Ö., Joyce, C. E., Moreira Teixeira, L. S., Rech, A., Jiang, A., Calamari, E., Jalili-Firoozinezhad, S., Furlong, B. A., O’Sullivan, L. R., Ng, C. F., Choe, Y., Marquez, S., Myers, K. C., Weinberg, O. K., Hasserjian, R. P., Novak, R., Levy, O., Prantil-Baun, R., Novina, C. D., Shimamura, A., Ewart, L., and Ingber, D. E. (2020). On-chip recapitulation of clinical bone marrow toxicities and patient-specific pathophysiology. *Nature Biomedical Engineering*, 4(4):394–406.
- Chramiec, A. and Vunjak-Novakovic, G. (2019). Tissue engineered models of healthy and malignant human bone marrow. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 140:78–92.
- Christofferson, J. (2018). *Organs-on-chips for the pharmaceutical development process: design perspectives and implementations*. PhD thesis, Linköping University.

- Chung, C. A., Chen, C. W., Chen, C. P., and Tseng, C. S. (2007). Enhancement of cell growth in tissue-engineering constructs under direct perfusion: Modeling and simulation. *Biotechnology and Bioengineering*, 97(6):1603–1616.
- Chung, C. A., Yang, C. W., and Chen, C. W. (2006). Analysis of cell growth and diffusion in a scaffold for cartilage tissue engineering. *Biotechnology and Bioengineering*, 94(6):1138–1146.
- Coletti, F., Macchietto, S., and Elvassore, N. (2006). Mathematical modeling of three-dimensional cell cultures in perfusion bioreactors. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 45(24):8158–8169.
- Comina, G., Suska, A., and Filippini, D. (2014). PDMS lab-on-a-chip fabrication using 3D printed templates. *Lab on a Chip*, 14(2):424–430.
- Contois, D. E. (1959). Kinetics of Bacterial Growth: Relationship between Population Density and Specific Growth Rate of Continuous Cultures. *Journal of General Microbiology*, 21(1):40–50.
- Convery, N. and Gadegaard, N. (2019). 30 Years of Microfluidics. *Micro and Nano Engineering*, 2(January):76–91.
- Crane, G. M., Jeffery, E., and Morrison, S. J. (2017). Adult haematopoietic stem cell niches. *Nature Reviews Immunology*, 17(9):573–590.
- Dafni, H., Israely, T., Bhujwala, Z. M., Benjamin, L. E., and Neeman, M. (2002). Overexpression of vascular endothelial growth factor 165 drives peritumor interstitial convection and induces lymphatic drain: Magnetic resonance imaging, confocal microscopy, and histological tracking of triple-labeled albumin. *Cancer Research*, 62(22):6731–6739.
- Damiano, J. S., Cress, A. E., Hazlehurst, L. A., Shtil, A. A., and Dalton, W. S. (1999). Cell adhesion mediated drug resistance (CAM-DR): Role of integrins and resistance to apoptosis in human myeloma cell lines. *Blood*, 93(5):1658–1667.
- Darcy, H. P. G. (1856). *Les Fontaines publiques de la ville de Dijon. Exposition et application des principes à suivre et des formules à employer dans les questions de distribution d'eau, etc.* Victor Dalamont.
- Dhumpa, R. and Roper, M. G. (2012). Temporal gradients in microfluidic systems to probe cellular dynamics: A review. *Analytica chimica acta*, 743:9–18.
- DiMasi, J. A., Grabowski, H. G., and Hansen, R. W. (2016). Innovation in the pharmaceutical industry: New estimates of R&D costs. *Journal of Health Economics*, 47:20–33.
- Duval, K., Grover, H., Han, L. H., Mou, Y., Pegoraro, A. F., Fredberg, J., and Chen, Z. (2017). Modeling physiological events in 2D vs. 3D cell culture. *Physiology*, 32(4):266–277.

- Ebewele, R. O. (2000). *Polymer science and technology*. CRC press.
- Edmondson, R., Broglie, J. J., Adcock, A. F., and Yang, L. (2014). Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors. *Assay and Drug Development Technologies*, 12(4):207–218.
- Ehrmann, R. L. and Gey, G. O. (1956). The growth of cells on a transparent gel of reconstituted rat-tail collagen. *Journal of the National Cancer Institute*, 16(6):1375–1403.
- Eliasson, P. and Jönsson, J. I. (2010). The hematopoietic stem cell niche: Low in oxygen but a nice place to be. *Journal of Cellular Physiology*, 222(1):17–22.
- Ellis, S. L. and Nilsson, S. K. (2012). The location and cellular composition of the hemopoietic stem cell niche. *Cytotherapy*, 14(2):135–143.
- Engler, A. J., Richert, L., Wong, J. Y., Picart, C., and Discher, D. E. (2004). Surface probe measurements of the elasticity of sectioned tissue, thin gels and polyelectrolyte multilayer films: Correlations between substrate stiffness and cell adhesion. *Surface Science*, 570(1-2):142–154.
- Ericsson, A. C., Crim, M. J., and Franklin, C. L. (2013). A brief history of animal modeling. *Missouri medicine*, 110(3):201–205.
- Ertl, P., Sticker, D., Charwat, V., Kasper, C., and Lepperdinger, G. (2014). Lab-on-a-chip technologies for stem cell analysis. *Trends in biotechnology*, 32(5):245–253.
- Esch, E. W., Bahinski, A., and Huh, D. (2015). Organs-on-chips at the frontiers of drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*, 14(4):248–260.
- European Commission (2010). Directive 2010/63/eu of the european parliament and of the council of 22 september 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. *Official Journal of the European Union*, 276:33–79.
- Eyckmans, J., Boudou, T., Yu, X., and Chen, C. S. (2011). A Hitchhiker’s Guide to Mechanobiology. *Developmental Cell*, 21(1):35–47.
- Ferraz, M. d. A. M. M., Nagashima, J. B., Venzac, B., Le Gac, S., and Songsasen, N. (2020). 3D printed mold leachates in PDMS microfluidic devices. *Scientific Reports*, 10(1):1–9.
- Feynman, R. F. (1992). There’s Plenty of Room at the Bottom. *Journal of Microelectromechanical*, 1(1):60–66.

- Gibson, I., Rosen, D., and Stucker, B. (2015). *Additive manufacturing technologies: 3D printing, rapid prototyping, and direct digital manufacturing, second edition*. Johnson Matthey Technology Review.
- Glaser, D. E., Curtis, M. B., Sariano, P. A., Rollins, Z. A., Shergill, S., Anand, A., Deely, A. M., Shirure, V. S., Anderson, L., Lowen, J. M., Ng, N. R., Weilbaecher, K., Link, D. C., George, S. C., Shergill, B. S., Anand, A., Deely, A. M., Shirure, V. S., Anderson, L., Lowen, J. M., Ng, N. R., Weilbaecher, K., Link, D. C., and George, S. C. (2020). Organ-on-a-chip model of vascularized human bone marrow niches. *bioRxiv* 202.04, page 17.039339.
- Gokaltun, A., Yarmush, M. L., Asatekin, A., and Usta, O. B. (2017). Recent advances in nonbiofouling PDMS surface modification strategies applicable to microfluidic technology. *Technology*, 05(01):1–12.
- Gori, J. L., Butler, J. M., Chan, Y. Y., Chandrasekaran, D., Poulos, M. G., Ginsberg, M., Nolan, D. J., Elemento, O., Wood, B. L., Adair, J. E., Rafii, S., and Kiem, H. P. (2015). Vascular niche promotes hematopoietic multipotent progenitor formation from pluripotent stem cells. *Journal of Clinical Investigation*, 125(3):1243–1254.
- Goto, M., Miwa, H., Suganuma, K., Tsunekawa-Imai, N., Shikami, M., Mizutani, M., Mizuno, S., Hanamura, I., and Nitta, M. (2014). Adaptation of leukemia cells to hypoxic condition through switching the energy metabolism or avoiding the oxidative stress. *BMC Cancer*, 14(1):1–9.
- Griffith, L. G. and Swartz, M. A. (2006). Capturing complex 3D tissue physiology in vitro. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7(3):211–224.
- Guéguen, Y., Gavrilenko, P., and Le Ravalec, M. (1996). Scales of rock permeability. *Surveys in Geophysics*, 17(3):245–263.
- Gulati, G. L., Ashton, J. K., and Hyun, B. H. (1988). Structure and function of the bone marrow and hematopoiesis. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, 2(4):495–511.
- Gurkan, U. A. and Akkus, O. (2008). The mechanical environment of bone marrow: A review. *Annals of Biomedical Engineering*, 36(12):1978–1991.
- Ham, J., Lever, L., Fox, M., and Reagan, M. R. (2019). In Vitro 3D Cultures to Reproduce the Bone Marrow Niche. *JBMR Plus*, 3(10):e10228.
- Harrison, R. G. (1910). The outgrowth of the nerve fiber as a mode of protoplasmic movement. *Journal of Experimental Zoology*, 9(4):787–846.

- Harrison, R. G., Greenman, M. J., Mall, F. P., and Jackson, C. M. (1907). Observations of the living developing nerve fiber. *The Anatomical Record*, 1(5):116–128.
- Hay, M., Thomas, D. W., Craighead, J. L., Economides, C., and Rosenthal, J. (2014). Clinical development success rates for investigational drugs. *Nature Biotechnology*, 32(1):40–51.
- He, N., Zhang, L., Cui, J., and Li, Z. (2014). Bone Marrow Vascular Niche: Home for Hematopoietic Stem Cells. *Bone Marrow Research*, 2014:1–8.
- Herland, A., Maoz, B. M., Das, D., Somayaji, M. R., Prantil-Baun, R., Novak, R., Cronce, M., Huffstater, T., Jeanty, S. S., Ingram, M., Chalkiadaki, A., Benson Chou, D., Marquez, S., Delahanty, A., Jalili-Firoozinezhad, S., Milton, Y., Sontheimer-Phelps, A., Swenor, B., Levy, O., Parker, K. K., Przekwas, A., and Ingber, D. E. (2020). Quantitative prediction of human pharmacokinetic responses to drugs via fluidically coupled vascularized organ chips. *Nature Biomedical Engineering*, 4(4):421–436.
- Hillborg, H., Ankner, J. F., Gedde, U. W., Smith, G. D., Yasuda, H. K., and Wikström, K. (2000). Crosslinked polydimethylsiloxane exposed to oxygen plasma studied by neutron reflectometry and other surface specific techniques. *Polymer*, 41(18):6851–6863.
- Hillborg, H. and Gedde, U. (1999). Hydrophobicity changes in silicone rubbers. *IEEE Transactions on Dielectrics and Electrical Insulation*, 6(5):703–717.
- Hillsley, M. V. and Frangos, J. A. (1994). Bone tissue engineering: the role of interstitial fluid flow. *Biotechnology and bioengineering*, 43(7):573–581.
- Ho, C. M. B., Ng, S. H., Li, K. H. H., and Yoon, Y. J. (2015). 3D printed microfluidics for biological applications. *Lab on a Chip*, 15(18):3627–3637.
- Hoarau-Véchet, J., Rafii, A., Touboul, C., and Pasquier, J. (2018). Halfway between 2D and animal models: Are 3D cultures the ideal tool to study cancer-microenvironment interactions? *International Journal of Molecular Sciences*, 19:181.
- Houshmand, M., Blanco, T. M., Circosta, P., Yazdi, N., Kazemi, A., Saglio, G., and Zarif, M. N. (2019). Bone marrow microenvironment: The guardian of leukemia stem cells. *World Journal of Stem Cells*, 11(8):476–490.
- Houshmand, M., Soleimani, M., Atashi, A., Saglio, G., Abdollahi, M., and Zarif, M. N. (2017). Mimicking the Acute Myeloid Leukemia Niche for Molecular Study and Drug Screening. *Tissue Engineering - Part C: Methods*, 23(2):72–85.
- Huh, D., Hamilton, G. A., and Ingber, D. E. (2011). From 3D cell culture to organs-on-chips. *Trends in Cell Biology*, 21(12):745–754.

- Huh, D., Matthews, B. D., Mammoto, A., Montoya-Zavala, M., Yuan Hsin, H., and Ingber, D. E. (2010). Reconstituting organ-level lung functions on a chip. *Science*, 328(5986):1662–1668.
- Hull, C. W. (1984). Apparatus for production of three-dimensional objects by stereolithography.
- Humayun, M., Chow, C. W., and Young, E. W. (2018). Microfluidic lung airway-on-a-chip with arrayable suspended gels for studying epithelial and smooth muscle cell interactions. *Lab on a Chip*, 18(9):1298–1309.
- Hutter, J. J. (2010). Childhood leukemia. *Pediatrics in Review*, 31(6):234–241.
- Ingavle, G., Vaidya, A., and Kale, V. (2019). Constructing Three-Dimensional Micro-environments Using Engineered Biomaterials for Hematopoietic Stem Cell Expansion. *Tissue Engineering - Part B: Reviews*, 25(4):312–329.
- Ingber, D. E. (1997). Tensegrity: The architectural basis of cellular mechanotransduction. *Annual Review of Physiology*, 59:575–599.
- Ingber, D. E. (2003a). Mechanobiology and diseases of mechanotransduction. *Annals of Medicine*, 35(8):564–577.
- Ingber, D. E. (2003b). Tensegrity I. Cell structure and hierarchical systems biology. *Journal of Cell Science*, 116(7):1157–1173.
- Ivanovska, I. L., Shin, J.-W., Swift, J., and Discher, D. E. (2015). Stem cell mechanobiology: diverse lessons from bone marrow. *Trends Cell Biol*, 25(9):523–532.
- Izdihar, K., Razak, H. R. A., Supion, N., Karim, M. K. A., Osman, N. H., and Norkhairunisa, M. (2021). Structural, mechanical, and dielectric properties of polydimethylsiloxane and silicone elastomer for the fabrication of clinical-grade kidney phantom. *Applied Sciences (Switzerland)*, 11(3):1–13.
- Jalili-Firoozinezhad, S., Prantil-Baun, R., Jiang, A., Potla, R., Mammoto, T., Weaver, J. C., Ferrante, T. C., Kim, H. J., Cabral, J. M., Levy, O., and Ingber, D. E. (2018). Modeling radiation injury-induced cell death and countermeasure drug responses in a human Gut-on-a-Chip article. *Cell Death and Disease*, 9(2):1–14.
- Jansen, K. A., Donato, D. M., Balcioglu, H. E., Schmidt, T., Danen, E. H. J., and Koenderink, G. H. (2015). A guide to mechanobiology : Where biology and physics meet. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1853(11):3043–3052.
- Jiang, B., Zheng, W., Zhang, W., and Jiang, X. (2014). Organs on microfluidic chips: A mini review. *Science China Chemistry*, 57(3):356–364.

- Jo, B. H., Van Lerberghe, L. M., Motsegood, K. M., and Beebe, D. J. (2000). Three-dimensional micro-channel fabrication in polydimethylsiloxane (PDMS) elastomer. *Journal of Microelectromechanical Systems*, 9(1):76–81.
- Jodat, Y. A., Kang, M. G., Kiaee, K., Kim, G. J., Martinez, A. F., Rosenkranz, A., Bae, H., and Shin, S. R. (2018). Human-Derived Organ-on-a-Chip for Personalized Drug Development. *Current Pharmaceutical Design*, 24(45):5471–5486.
- Joshi, P. N. (2016). Cells and Organs on Chip—A Revolutionary Platform for Biomedicine. In *Intech*, pages 77–123. Lab-on-a-Chip Fabr. Appl., InTech.
- Kawaguchi, N., Hatta, K., and Nakanishi, T. (2013). 3D-culture system for heart regeneration and cardiac medicine. *BioMed research international*, 2013:8.
- Khin, Z. P., Ribeiro, M. L. C., Jacobson, T., Hazlehurst, L., Perez, L., Baz, R., Shain, K., and Silva, A. S. (2014). A preclinical assay for chemosensitivity in multiple myeloma. *Cancer Research*, 74(1):56–67.
- Kim, H. T. and Jeong, O. C. (2011). PDMS surface modification using atmospheric pressure plasma. *Microelectronic Engineering*, 88(8):2281–2285.
- Kim, K. M., Choi, Y. J., Hwang, J. H., Kim, A. R., Cho, H. J., Hwang, E. S., Park, J. Y., Lee, S. H., and Hong, J. H. (2014). Shear stress induced by an interstitial level of slow flow increases the osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells through TAZ activation. *PLoS ONE*, 9(3).
- Kim, M. H., Green, S. D., Lin, C. C., and Konig, H. (2021). Engineering Tools for Regulating Hypoxia in Tumour Models. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 25(16):7581–7592.
- Kitten, G. T., Kolker, S. J., Krob, S. L., and Klewer, S. E. (1996). Type VI collagen in the cardiac valves and connective tissue septa during heart development. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 29(1):57–62.
- Kitten, G. T., Markwald, R. R., and Runyan, R. B. (1982). Parameters influencing formation and migration of cardiac mesenchymal cells in three dimensional collagen gels. In Hawkes, S. and Wang, J., editors, *Extracellular Matrix*, pages 159–163. Academic Press, New York.
- Kocabas, F., Xie, L., Xie, J., Yu, Z., DeBerardinis, R. J., Kimura, W., Thet, S. W., Elshamy, A. F., Abouellail, H., Muralidhar, S., Liu, X., Chen, C., Sadek, H. A., Zhang, C. C., and Zheng, J. (2015). Hypoxic metabolism in human hematopoietic stem cells. *Cell and Bioscience*, 5(1):18–25.

- Kotha, S. S. S., Hayes, B. J. J., Phong, K. T. T., Redd, M. A. A., Bomsztyk, K., Ramakrishnan, A., Torok-Storb, B., and Zheng, Y. (2018). Engineering a multicellular vascular niche to model hematopoietic cell trafficking. *Stem Cell Research and Therapy*, 9(1):1–14.
- Kumar, R., Godavarthy, P. S., and Krause, D. S. (2018). The bone marrow microenvironment in health and disease at a glance. *Journal of Cell Science*, 131(4):jcs201707.
- Lai, V. K., Frey, C. R., Kerandi, A. M., Lake, S. P., Tranquillo, R. T., and Barocas, V. H. (2012a). Microstructural and mechanical differences between digested collagen-fibrin co-gels and pure collagen and fibrin gels. *Acta Biomaterialia*, 8(11):4031–4042.
- Lai, V. K., Lake, S. P., Frey, C. R., Tranquillo, R. T., and Barocas, V. H. (2012b). Mechanical behavior of collagen-fibrin co-gels reflects transition from series to parallel interactions with increasing collagen content. *Journal of Biomechanical Engineering*, 134(1):1–9.
- Lam, C. R. I., Wong, H. K., Nai, S., Chua, C. K., Tan, N. S., and Tan, L. P. (2014). A 3D biomimetic model of tissue stiffness interface for cancer drug testing. *Molecular pharmaceutics*, 11(7):2016–2021.
- Laquieze, L., Lorencini, M., and Granjeiro, J. M. (2015). Alternative Methods to Animal Testing and Cosmetic Safety: An Update on Regulations and Ethical Considerations in Brazil. *Applied In Vitro Toxicology*, 1(4):243–253.
- Lee, G. H., Huang, S. A., Aw, W. Y., Rathod, M. L., Cho, C., Ligler, F. S., and Polacheck, W. J. (2022). Multilayer microfluidic platform for the study of luminal, transmural, and interstitial flow. *Biofabrication*, 14(2).
- Lee, K. H., Lee, D. W., and Kang, B. C. (2020). The ‘R’ principles in laboratory animal experiments. *Laboratory Animal Research*, 36(1):45–47.
- Lee, S., Porter, M., Wasko, S., Lau, G., Chen, P. Y., Novitskaya, E. E., Tomsia, A. P., Almutairi, A., Meyers, M. A., and McKittrick, J. (2012). Potential bone replacement materials prepared by two methods. *Materials Research Society Symposium Proceedings*, 1418:177–188.
- Li, G., Liu, X., Du, Q., Gao, M., and An, J. (2015). Three dimensional de novo micro bone marrow and its versatile application in drug screening and regenerative medicine. *Experimental Biology and Medicine*, 240(8):1029–1038.
- Lombardino, J. G. and Lowe, J. A. (2004). The role of the medicinal chemist in drug discovery - Then and now. *Nature Reviews Drug Discovery*, 3(10):853–862.

- Lucas, D. (2017). The Bone Marrow Microenvironment for Hematopoietic Stem Cells. *Advances in experimental medicine and biology*, 1041:5–18.
- Ma, C., Witkowski, M. T., Harris, J., Dolgalev, I., Sreeram, S., Qian, W., Tong, J., Chen, X., Aifantis, I., and Chen, W. (2020). Leukemia-on-a-chip: Dissecting the chemoresistance mechanisms in B cell acute lymphoblastic leukemia bone marrow niche. *Science Advances*, 6(44):eaba5536.
- Ma, L., Zhou, C., Lin, B., and Li, W. (2010). A porous 3D cell culture micro device for cell migration study. *Biomed Microdevices*, 12(4):753–760.
- Maksimov, A. (1909). Der Lymphozyt als gemeinsame Stammzelle der verschiedenen Blutelemente in der embry-onalen Entwicklung und im postfetalen Leben der Säugetiere. *Folia Haematol*, 8:125–134.
- Mammoto, T., Mammoto, A., and Ingber, D. E. (2013). Mechanobiology and developmental control. *Annual review of cell and developmental biology*, 29:27–61.
- Manz, A., Graber, N., and Widmer, H. á. (1990). Miniaturized total chemical analysis systems: a novel concept for chemical sensing. *Sensors and actuators B: Chemical*, 1(1-6):244–248.
- Marin, T. M. and Pagani, E. (2018). Microphysiological systems composed of human organoids in microfluidic devices: advances and challenges. *Vigilância Sanitária em Debate*, 6(2):74–91.
- Marturano-Kruik, A., Nava, M. M., Yeager, K., Chramiec, A., Hao, L., Robinson, S., Guo, E., Raimondi, M. T., and Vunjak-Novakovic, G. (2018). Human bone perivascular niche-on-a-chip for studying metastatic colonization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(6):1256–1261.
- Matellán Martín, C. (2015). *Tissue-on-a-chip design for skin modeling*. PhD thesis, Universidad Carlos III de Madrid.
- Matthews, H., Hanison, J., and Nirmalan, N. (2016). "Omics-informed drug and biomarker discovery: Opportunities, challenges and future perspectives. *Proteomes*, 4(3).
- McAleer, C. W., Long, C. J., Elbrecht, D., Sasserath, T., Bridges, L. R., Rumsey, J. W., Martin, C., Schnepfer, M., Wang, Y., Schuler, F., Roth, A. B., Funk, C., Shuler, M. L., and Hickman, J. J. (2019). Multi-organ system for the evaluation of efficacy and off-target toxicity of anticancer therapeutics. *Science Translational Medicine*, 11(497).
- Méndez-Ferrer, S., Bonnet, D., Steensma, D. P., Hasserjian, R. P., Ghobrial, I. M., Gribben, J. G., Andreeff, M., and Krause, D. S. (2020). Bone marrow niches in haematological malignancies. *Nature Reviews Cancer*, 20(5):285–298.

- Miller, P. G. G. and Shuler, M. L. L. (2016). Design and demonstration of a pumpless 14 compartment microphysiological system. *Biotechnology and Bioengineering*, 113(10):2213–2227.
- Montes, G. S. (1996). Structural biology of the fibres of the collagenous and elastic systems. *Cell Biology International*, 20(1):15–27.
- Moreno-Arotzena, O., Meier, J. G., Amo, C. D., and García-Aznar, J. M. (2015). Characterization of fibrin and collagen gels for engineering wound healing models. *Materials*, 8(4):1636–1651.
- Moreo, P., García-Aznar, J. M., and Doblaré, M. (2008). Modeling mechanosensing and its effect on the migration and proliferation of adherent cells. *Acta Biomaterialia*, 4(3):613–621.
- Morrison, S. J. and Scadden, D. T. (2014). The bone marrow niche for haematopoietic stem cells. *Nature*, 505(7483):327–334.
- Mroue, R. and Bissell, M. J. (2013). Three-Dimensional Cultures of Mouse Mammary Epithelial Cells. *Methods in Molecular Biology*, 945:221–250.
- Musah, S., Mammoto, A., Ferrante, T. C., Jeanty, S. S. F., Hirano-Kobayashi, M., Mammoto, T., Roberts, K., Chung, S., Novak, R., Ingram, M., Fatanat-Didar, T., Koshy, S., Weaver, J. C., Church, G. M., and Ingber, D. E. (2017). Mature induced-pluripotent-stem-cell-derived human podocytes reconstitute kidney glomerular-capillary-wall function on a chip. *Nat Biomed Eng*, 1:1–12.
- Nelson, M. R., Ghoshal, D., Rubio, D. F., Keith, E., Roy, K., Mejías, J. C., Rubio, D. F., Keith, E., and Roy, K. (2019). A Multi-Niche Microvascularized Human Bone-Marrow-on-a-Chip. *bioRxiv*, page 2019.12.15.876813.
- Nelson, M. R. and Roy, K. (2016). Bone-marrow mimicking biomaterial niches for studying hematopoietic stem and progenitor cells. *Journal of Materials Chemistry B*, 4(20):3490–3503.
- Neužil, P., Giselbrecht, S., Länge, K., Huang, T. J., and Manz, A. (2012). Revisiting lab-on-a-chip technology for drug discovery. *Nature reviews Drug discovery*, 11(8):620–632.
- Nge, P. N., Rogers, C. I., and Woolley, A. T. (2013). Advances in microfluidic materials, functions, integration, and applications. *Chemical Reviews*, 113(4):2550–2583.
- Nguyen, N.-T., Wereley, S. T., and House, A. (2006). *Fundamentals and Applications of Microfluidics*. Artech house.

- Nilsson, S. K., Debatis, M. E., Dooner, M. S., Madri, J. A., Quesenberry, P. J., and Becker, P. S. (1998). Immunofluorescence characterization of key extracellular matrix proteins in murine bone marrow in situ. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 46(3):371–377.
- Nilsson, S. K., Johnston, H. M., Whitty, G. A., Williams, B., Webb, R. J., Denhardt, D. T., Bertocello, I., Bendall, L. J., Simmons, P. J., and Haylock, D. N. (2005). Osteopontin, a key component of the hematopoietic stem cell niche and regulator of primitive hematopoietic progenitor cells. *Blood*, 106(4):1232–1239.
- Nwajei, F. and Konopleva, M. (2013). The bone marrow microenvironment as niche retreats for hematopoietic and leukemic stem cells. *Advances in Hematology*, 2013.
- Osswald, T. A. and Menges, G. (2012). *Material Science of Polymers for Engineers*. Carl Hanser Verlag GmbH Co KG.
- Ott, S. M. (2018). Cortical or trabecular bone: what’s the difference? *American journal of nephrology*, 47(6):373–376.
- Paim, Á., Cardozo, N. S., Pranke, P., and Tessaro, I. C. (2019). Sensitivity analysis for model comparison and selection in tissue engineering. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 36(1):383–391.
- Papadantonakis, N. and Advani, A. S. (2016). Recent advances and novel treatment paradigms in acute lymphocytic leukemia. *Therapeutic Advances in Hematology*, 7(5):252–269.
- Papandreou, I., Krishna, C., Kaper, F., Cai, D., Giaccia, A. J., and Denko, N. C. (2005). Anoxia is necessary for tumor cell toxicity caused by a low-oxygen environment. *Cancer Research*, 65(8):3171–3178.
- Pappas, D. (2016). Microfluidics and cancer analysis: cell separation, cell/tissue culture, cell mechanics, and integrated analysis systems. *Analyst*, 141(2):525–535.
- Paretsis, N. F., Gonçalves Junior, V., Hazarbassanov, N. G. T. d. Q., Marcondes, G. M., Plepis, A. M. d. G., Martins, V. d. C. A., Arana-Chavez, V. E., Fülber, J., and De Zoppa, A. L. D. V. (2021). In vitro evaluation of hydroxyapatite, chitosan, and carbon nanotube composite biomaterial to support bone healing. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 58.
- Parmar, K., Mauch, P., Vergilio, J. A., Sackstein, R., and Down, J. D. (2007). Distribution of hematopoietic stem cells in the bone marrow according to regional hypoxia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(13):5431–5436.

- Paul, S. M., Mytelka, D. S., Dunwiddie, C. T., Persinger, C. C., Munos, B. H., Lindborg, S. R., and Schacht, A. L. (2010). How to improve R&D productivity: the pharmaceutical industry's grand challenge. *Nature Reviews Drug Discovery*, 9(3):203–214.
- Penchansky, L. (2003). *Pediatric bone marrow*. Springer Science & Business Media.
- Peterson, N. C., Mahalingaiah, P. K., Fullerton, A., and Di Piazza, M. (2020). Application of microphysiological systems in biopharmaceutical research and development. *Lab on a Chip*, 20(4):697–708.
- Place, T. L., Domann, F. E., and Case, A. J. (2017). Limitations of oxygen delivery to cells in culture: An underappreciated problem in basic and translational research. *Free Radical Biology and Medicine*, 113(May):311–322.
- Polacheck, W. J., Charest, J. L., and Kamm, R. D. (2011). Interstitial flow influences direction of tumor cell migration through competing mechanisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(27):11115–11120.
- Polacheck, W. J., German, A. E., Mammoto, A., Ingber, D. E., and Kamm, R. D. (2014). Mechanotransduction of fluid stresses governs 3D cell migration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(7):2447–2452.
- Polacheck, W. J., Li, R., Uzel, S. G., and Kamm, R. D. (2013). Microfluidic platforms for mechanobiology. *Lab on a Chip*, 13(12):2252–2267.
- Polini, A., Prodanov, L., Bhise, N. S., Manoharan, V., Dokmeci, M. R., and Khademhosseini, A. (2014). Organs-on-a-chip: A new tool for drug discovery. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 9(4):335–352.
- Qin, D., Xia, Y., and Whitesides, G. M. (1996). Rapid prototyping of complex structures with feature sizes larger than 20 μm . *Advanced Materials*, 8(11):917–919.
- Qin, D., Xia, Y., and Whitesides, G. M. (2010). Soft lithography for micro- and nanoscale patterning. *Nature Protocols*, 5(3):491–502.
- Raic, A., Naolou, T., Mohra, A., Chatterjee, C., and Lee-Thedieck, C. (2019). 3D models of the bone marrow in health and disease: Yesterday, today, and tomorrow. *MRS Communications*, 9(1):37–52.
- Ratner, B. D. (2011). The biocompatibility manifesto: Biocompatibility for the twenty-first century. *Journal of Cardiovascular Translational Research*, 4(5):523–527.
- Raub, C. B., Suresh, V., Krasieva, T., Lyubovitsky, J., Mih, J. D., Putnam, A. J., Tromberg, B. J., and George, S. C. (2007). Noninvasive assessment of collagen gel microstructure and mechanics using multiphoton microscopy. *Biophysical Journal*, 92(6):2212–2222.

- Raub, C. B., Unruh, J., Suresh, V., Krasieva, T., Lindmo, T., Gratton, E., Tromberg, B. J., and George, S. C. (2008). Image correlation spectroscopy of multiphoton images correlates with collagen mechanical properties. *Biophysical Journal*, 94(6):2361–2373.
- Razavi Bazaz, S., Kashaninejad, N., Azadi, S., Patel, K., Asadnia, M., Jin, D., and Ebrahimi Warkiani, M. (2019). Rapid Softlithography Using 3D-Printed Molds. *Advanced Materials Technologies*, 4(10):1–11.
- Razavi Bazaz, S., Rouhi, O., Raoufi, M. A., Ejeian, F., Asadnia, M., Jin, D., and Ebrahimi Warkiani, M. (2020). 3D Printing of Inertial Microfluidic Devices. *Scientific Reports*, 10(1):1–14.
- Ren, K., Zhou, J., and Wu, H. (2013). Materials for microfluidic chip fabrication. *Accounts of Chemical Research*, 46(11):2396–2406.
- Riether, C., Schürch, C. M., and Oxsenbein, A. F. (2015). Regulation of hematopoietic and leukemic stem cells by the immune system. *Cell Death and Differentiation*, 22(2):187–198.
- Rigat-Brugarolas, L. G., Elizalde-Torrent, A., Bernabeu, M., De Niz, M., Martin-Jaular, L., Fernandez-Becerra, C., Homs-Corbera, A., Samitier, J., and Del Portillo, H. A. (2014). A functional microengineered model of the human splenon-on-a-chip. *Lab on a Chip*, 14(10):1715–1724.
- Rosalem, G. S., Torres, L. A. G., de Las Casas, E. B., Mathias, F. A. S., Ruiz, J. C., and Carvalho, M. G. R. (2020). Microfluidics and organ-on-a-chip technologies: A systematic review of the methods used to mimic bone marrow. *PLoS ONE*, 15(12):1–31.
- Russell, W. M. S. and Burch, R. L. (1959). *The principles of humane experimental technique*. Methuen.
- Rutkowski, J. M. and Swartz, M. A. (2007). A driving force for change: interstitial flow as a morphoregulator. *Trends in Cell Biology*, 17(1):44–50.
- Sackmann, E. K., Fulton, A. L., and Beebe, D. J. (2014). The present and future role of microfluidics in biomedical research. *Nature*, 507(7491):181–189.
- Schofield, R. (1978). The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood cells*, 4(1-2):7–25.
- Sell, S. (2005). Leukemia: Stem cells, maturation arrest, and differentiation therapy. *Stem Cell Reviews*, 1(3):197–206.
- Shanks, N., Greek, R., and Greek, J. (2009). Are animal models predictive for humans? *Philosophy, Ethics, and Humanities in Medicine*, 4(1):1–20.

- Shin, J. W., Buxboim, A., Spinler, K. R., Swift, J., Christian, D. A., Hunter, C. A., León, C., Gachet, C., Dingal, P. C. P., Ivanovska, I. L., Rehfeldt, F., Chasis, J. A., and Discher, D. E. (2014). Contractile forces sustain and polarize hematopoiesis from stem and progenitor cells. *Cell Stem Cell*, 14(1):81–93.
- Shin, Y., Han, S., Jeon, J. S., Yamamoto, K., Zervantonakis, I. K., Sudo, R., Kamm, R. D., and Chung, S. (2012). Microfluidic assay for simultaneous culture of multiple cell types on surfaces or within hydrogels. *Nat Protoc*, 7(7):1247–1259.
- Sie, L., Loong, S., and Tan, E. K. (2009). Utility of lymphoblastoid cell lines. *Journal of Neuroscience Research*, 87(9):1953–1959.
- Siler, U., Seiffert, M., Puch, S., Richards, A., Torok-Storb, B., Müller, C. A., Sorokin, L., and Klein, G. (2000). Characterization and functional analysis of laminin isoforms in human bone marrow. *Blood*, 96(13):4194–4203.
- Song, Y., Cheng, D., and Zhao, L. (2018). *Microfluidics: Fundamentals, Devices and Applications*. John Wiley & Sons.
- Sosa-Hernández, J. E., Villalba-Rodríguez, A. M., Romero-Castillo, K. D., Aguilar-Aguila-Isaías, M. A., García-Reyes, I. E., Hernández-Antonio, A., Ahmed, I., Sharma, A., Parra-Saldívar, R., and Iqbal, H. M. (2018). Organs-on-a-chip module: A review from the development and applications perspective. *Micromachines*, 9(10).
- Stuart, K. and Panitch, A. (2008). Influence of chondroitin sulfate on collagen gel structure and mechanical properties at physiologically relevant levels. *Biopolymers*, 89(10):841–851.
- Sugiyama, T., Kohara, H., Noda, M., and Nagasawa, T. (2006). Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches. *Immunity*, 25(6):977–988.
- Sung, J. H., Kam, C., and Shuler, M. L. (2010). A microfluidic device for a pharmacokinetic-pharmacodynamic (PK-PD) model on a chip. *Lab on a Chip*, 10(4):446–455.
- Sung, J. H. and Shuler, M. L. (2009a). A micro cell culture analog (CCA) with 3-D hydrogel culture of multiple cell lines to assess metabolism-dependent cytotoxicity of anti-cancer drugs. *Lab on a Chip*, 9(10):1385–1394.
- Sung, J. H. and Shuler, M. L. (2009b). Prevention of air bubble formation in a microfluidic perfusion cell culture system using a microscale bubble trap. *Biomedical Microdevices*, 11(4):731–738.
- Sutherland, R. M., McCredie, J. A., and Inch, W. R. (1971). Growth of multicell spheroids in tissue culture as a model of nodular carcinomas. *Journal of the National Cancer Institute*, 46(1):113–120.

- Svendsen, W. E. and Castillo-León, J. (2015). *Lab-on-a-Chip Devices and Micro-Total Analysis Systems*. Springer.
- Tabe, Y. and Konopleva, M. (2014). Advances in understanding the leukaemia microenvironment. *British Journal of Haematology*, 164(6):767–778.
- Tabe, Y. and Konopleva, M. (2017). Leukemia stem cells microenvironment. In *Stem Cell Microenvironments and Beyond*, pages 19–32. Springer.
- Tabeling, P. (2005). *Introduction to Microfluidic*. OUP Oxford.
- Taichman, R. S., Reilly, M. J., and Emerson, S. G. (1996). Human osteoblasts support human hematopoietic progenitor cells in in vitro bone marrow cultures. *Blood*, 87(2):518–524.
- Tan, S. H., Nguyen, N. T., Chua, Y. C., and Kang, T. G. (2010). Oxygen plasma treatment for reducing hydrophobicity of a sealed polydimethylsiloxane microchannel. *Biomicrofluidics*, 4(3):1–8.
- Tannenbaum, J. and Bennett, B. T. (2015). Russell and Burch’s 3Rs then and now: The need for clarity in definition and purpose. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 54(2):120–132.
- Terwilliger, T. and Abdul-Hay, M. (2017). Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update. *Blood cancer journal*, 7(6):e577.
- Torisawa, Y.-s. (2019). Engineering bone marrow-on-a-chip. *Microphysiological Systems*, 3:2–2.
- Torisawa, Y. S., Mammoto, T., Jiang, E., Jiang, A., Mammoto, A., Watters, A. L., Bahinski, A., and Ingber, D. E. (2016). Modeling Hematopoiesis and Responses to Radiation Countermeasures in a Bone Marrow-on-a-Chip. *Tissue Engineering - Part C: Methods*, 22(5):509–515.
- Torisawa, Y. S., Spina, C. S., Mammoto, T., Mammoto, A., Weaver, J. C., Tat, T., Collins, J. J., and Ingber, D. E. (2014). Bone marrow-on-a-chip replicates hematopoietic niche physiology in vitro. *Nature Methods*, 11(6):663–669.
- Travlos, G. S. (2006). Normal Structure, Function, and Histology of the Bone Marrow. *Toxicologic Pathology*, 34(5):548–565.
- Valverde, T. M., Castro, E. G., Cardoso, M. H., Martins-Júnior, P. A., Souza, L. M., Silva, P. P., Ladeira, L. O., and Kitten, G. T. (2016). A novel 3D bone-mimetic scaffold composed of collagen/MTA/MWCNT modulates cell migration and osteogenesis. *Life Sciences*, 162:115–124.

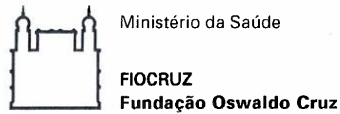
- Venzac, B., Deng, S., Mahmoud, Z., Lenferink, A., Costa, A., Bray, F., Otto, C., Rolando, C., and Le Gac, S. (2021). PDMS Curing Inhibition on 3D-Printed Molds: Why? Also, How to Avoid It? *Analytical Chemistry*, 93(19):7180–7187.
- Vishwakarma, A. and Jeffrey, M. K. (2017). *Biology and Engineering of Stem Cell Niches*. Academic Press.
- Wagner, B. A., Venkataraman, S., and Buettner, G. R. (2011). The rate of oxygen utilization by cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 51(3):700–712.
- Wang, S. A. and Hasserjian, R. P. (2018). *Diagnosis of blood and bone marrow disorders*. Springer.
- Wang, X., Phan, D. T. T., Sobrino, A., George, S. C., Hughes, C. C. W., and Lee, A. P. (2016). Engineering anastomosis between living capillary networks and endothelial cell-lined microfluidic channels. *Lab on a Chip*, 16(2):282–290.
- Wang, Z., Samanipour, R., Koo, K. I., and Kim, K. (2015). Organ-on-a-chip platforms for drug delivery and cell characterization: A review. *Sensors and Materials*, 27(6):487–506.
- Weber, H. J. and Arfken, G. B. (2003). *Essential Mathematical Methods for Physicists*. Elsevier.
- Weiss, L. and Sakai, H. (1984). The hematopoietic stroma. *The American Journal of Anatomy*, 170:447–463.
- Whitesides, G. M. (2006). The origins and the future of microfluidics. *Nature*, 442(7101):368–373.
- Whitesides, G. M., Ostuni, E., Jiang, X., and Ingber, D. E. (2001). Soft Lithography in Biology and Biochemistry. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 3:335–73.
- Wielockx, B., Grinenko, T., Mirtschink, P., and Chavakis, T. (2019). Hypoxia Pathway Proteins in Normal and Malignant Hematopoiesis. *Cells*, 8(2):155.
- Wolfenson, H., Yang, B., and Sheetz, M. P. (2019). Steps in Mechanotransduction Pathways that Control Cell Morphology. *Annual Review of Physiology*, 81:585–602.
- Xia, Y. and Whitesides, G. M. (1998). Soft lithography. *Annual Review of Materials Science*, 28(1):153–184.
- Xiong, B., Ren, K., Shu, Y., Chen, Y., Shen, B., and Wu, H. (2014). Recent developments in microfluidics for cell studies. *Advanced Materials*, 26(31):5525–5532.
- Yamamura, N., Sudo, R., Ikeda, M., and Tanishita, K. (2007). Effects of the mechanical properties of collagen gel on the in vitro formation of microvessel networks by endothelial cells. *Tissue Engineering*, 13(7):1443–1453.

- Yoon, K.-A., Cho, H.-S., Shin, H.-I., and Cho, J.-Y. (2012). Differential regulation of CXCL5 by FGF2 in osteoblastic and endothelial niche cells supports hematopoietic stem cell migration. *Stem cells and development*, 21(18):3391–3402.
- Yum, K., Hong, S. G., Healy, K. E., and Lee, L. P. (2014). Physiologically relevant organs on chips. *Biotechnology Journal*, 9(1):16–27.
- Zhang, B., Korolj, A., Lai, B. F. L., and Radisic, M. (2018). Advances in organ-on-a-chip engineering. *Nature Reviews Materials*, 3(8):257–278.
- Zhang, P., Zhang, C., Li, J., Han, J., Liu, X., and Yang, H. (2019). The physical microenvironment of hematopoietic stem cells and its emerging roles in engineering applications. *Stem Cell Research and Therapy*, 10(1):1–13.
- Zhang, W., Gu, Y., Sun, Q., Siegel, D. S., Tolias, P., Yang, Z., Lee, W. Y., and Zilberberg, J. (2015). Ex vivo maintenance of primary human multiple myeloma cells through the optimization of the osteoblastic niche. *PLoS ONE*, 10(5):1–19.
- Zhang, W., Lee, W. Y., Siegel, D. S., Tolias, P., and Zilberberg, J. (2014). Patient-specific 3D microfluidic tissue model for multiple myeloma. *Tissue Engineering - Part C: Methods*, 20(8):663–670.
- Zheng, F., Fu, F., Cheng, Y., Wang, C., Zhao, Y., and Gu, Z. (2016a). Organ-on-a-Chip Systems: Microengineering to Biomimic Living Systems. *Small*, 12(17):2253–2282.
- Zheng, W., Jiang, B., Wang, D., Zhang, W., Wang, Z., and Jiang, X. (2012). A microfluidic flow-stretch chip for investigating blood vessel biomechanics. *Lab on a Chip*, 12(18):3441–3450.
- Zheng, Y., Dai, W., Ryan, D., and Wu, H. (2010). Fabrication of freestanding, microperforated membranes and their applications in microfluidics. *Biomicrofluidics*, 4(3):036504.
- Zheng, Y., Sun, Y., Yu, X., Shao, Y., Zhang, P., Dai, G., and Fu, J. (2016b). Angiogenesis in liquid tumors: An in-vitro assay for leukemic cell induced bone marrow angiogenesis. *Adv Healthc Mater*, 5(9):1014–1024.
- Zhong, W., Ji, X., Li, C., Fang, J., and Liu, F. (2018). Determination of permeability and inertial coefficients of sintered metal porous media using an isothermal chamber. *Applied Sciences (Switzerland)*, 8(9).
- Zhou, J., Ellis, A. V., and Voelcker, N. H. (2010). Recent developments in PDMS surface modification for microfluidic devices. *Electrophoresis*, 31(1):2–16.
- Zipursky, A., Bow, E., Seshadri, R. S., and Brown, E. J. (1976). Leukocyte density and volume in normal subjects and in patients with acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 48(3):361–371.

Zustiak, S., Nossal, R., and Sackett, D. L. (2014). Multiwell stiffness assay for the study of cell responsiveness to cytotoxic drugs. *Biotechnology and Bioengineering*, 111(2):396–403.

Anexos

ANEXO A – Documento da Fiocruz de
recomendação de depósito prioritário da
patente



DECISÃO REFERENTE AO DEPÓSITO DE PEDIDO PRIORITÁRIO

165a REUNIÃO DA COMISSÃO DE PATENTES DA FIOCRUZ

O invento intitulado "Dispositivo Organ-on-a-Chip para a mimetização do microambiente da medula óssea" – SOL. 00701759.2022

foi avaliado(a) tendo como parâmetros as informações contidas no Dossiê da Tecnologia e os critérios¹ da Portaria PR 5346/2020 para decisão sobre depósito de pedido prioritário.

Dessa forma, os integrantes da Comissão de Patentes, abaixo qualificados, tomam a seguinte decisão sobre o depósito de pedido prioritário no Brasil, referente ao invento:

Depositar

Não depositar


Recomendações/ Observações

A Comissão recomenda o desenvolvimento e validação de ensaios biológicos associados ao dispositivo, estabelecendo parcerias internas ou externas para esse desenvolvimento.

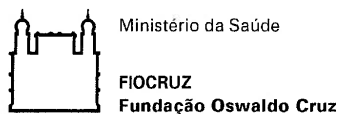
Votação

A favor	10
Contra	00
Abstenções	00
TOTAL	10

Rio de Janeiro, 04/08/2022

Nome	Assinatura	Situação
Adriana Campos Moreira Britto <small>Em substituição à Carla Maia Einsiedler, conforme possibilidade descrita na Portaria PR 5346/2020</small>		Participação remota
Carlos Medicis Morel		Participação remota
Daniel Savignon Marinho		Participação remota

¹ A Comissão deverá levar em consideração os seguintes critérios na decisão acerca do depósito de pedido de patente no exterior. Os critérios elencados nos itens 7.8 e 7.9 deverão ser avaliados pela Comissão de forma articulada, não sendo necessário o atendimento de todos eles para a decisão pelo depósito ou não. (PR 5346 art. 7.8 e 7.10).



DECISÃO REFERENTE AO DEPÓSITO DE PEDIDO PRIORITÁRIO

165a REUNIÃO DA COMISSÃO DE PATENTES DA FIOCRUZ

O invento intitulado "Dispositivo Organ-on-a-Chip para a mimetização do microambiente da medula óssea" – SOL. 00701759.2022

Nome	Assinatura	Situação
Gabriel Limaverde-Sousa		Participação remota
Luciane Pinto Gaspar		Participação remota
Marcos da Silva Freire		Participação remota
Maria Celeste Emerick		Participação remota
Martin Hernan Bonamino		Participação remota
Nilson Ivo Tonin Zanchin		Participação remota
Ramon Neves		Participação remota

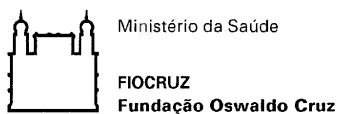
Registro de participantes (além dos membros da COPAT):

1. Representantes do grupo de pesquisa:

Nome	Situação
Gabriel dos Santos Rosalem	Participação remota
Jeronimo Conceição Ruiz	Participação remota
Maria Gabriela Reis Carvalho	Participação remota

2. Representantes do NIT:

Nome	Situação
Cristina Lima Carrara Carvalho	Participação remota



DECISÃO REFERENTE AO DEPÓSITO DE PEDIDO PRIORITÁRIO

165a REUNIÃO DA COMISSÃO DE PATENTES DA FIOCRUZ

O invento intitulado "Dispositivo Organ-on-a-Chip para a mimetização do microambiente da medula óssea" – SOL. 00701759.2022

3. Representantes da Gestec:

Nome	Assinatura	Situação
Bruno Brocky		Participação remota
Caroline da Silva Moraes		Participação remota
Diego Pereira Siqueira		Participação remota
Érica Riskalla Anchite Vieira		Participação remota
Juliana Przybylsca Yañez		Participação remota
Leonardo Silva Leite		Participação remota
Marcia de Andrade Amaral		Participação remota
Melissa da Silva Carvalho		Participação remota
Pedro Caldas Duarte		Participação remota