



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**

**Faculdade de Engenharia Química**

**FRANCIELE FLORES VIT**

**DISPOSITIVO MICROFLUÍDICO REVERSÍVEL E  
REUTILIZÁVEL PARA ANALISAR O COMPORTAMENTO  
CELULAR EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE  
FÁRMACOS**

**REVERSIBLE AND REUSABLE MICROFLUIDIC DEVICE TO  
ANALYZE CELL BEHAVIOR AT DIFFERENT DRUGS  
CONCENTRATIONS**

Campinas

2021

**FRANCIELE FLORES VIT**

**DISPOSITIVO MICROFLUÍDICO REVERSÍVEL E REUTILIZÁVEL  
PARA O ESTUDO DO COMPORTAMENTO CELULAR EM  
DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE FÁRMACOS**

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Engenharia Química da **Universidade Estadual de Campinas** como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Doutora em Engenharia Química.

**Orientadora:** Prof<sup>ª</sup> Dra. Lucimara Gaziola de a Torre

**Coorientador:** Prof. Dr. Hernandes Faustino de Carvalho

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À  
VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA  
PELO ALUNA FRANCIELE FLORES VIT, E  
ORIENTADA PELA PROFA. DRA.  
LUCIMARA GAZIOLA DE LA TORRE E  
COORENTADO PELO PROF. DR.  
HERNANDES FAUSTINO DE CARVALHO.

Campinas

2021

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca da Área de Engenharia e Arquitetura  
Rose Meire da Silva - CRB 8/5974

V83d Vit, Franciele Flores, 1985-  
Dispositivo microfluídico reversível e reutilizável para o estudo do comportamento celular em diferentes concentrações de fármacos / Franciele Flores Vit. – Campinas, SP : [s.n.], 2021.

Orientador: Lucimara Gaziola de la Torre.  
Coorientador: Hernandes Faustino de Carvalho.  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Microfluídica. 2. Fármaco. 3. Células. 4. Câncer. 5. Esferoides celulares. 6. Polidimetilsiloxano. I. Torre, Lucimara Gaziola de la, 1971-. II. Carvalho, Hernandes Faustino de, 1965-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Reversible and reusable microfluidic device to analyze cell behavior at different drugs concentrations

**Palavras-chave em inglês:**

Microfluidics

Drugs

Cells

Cancer

Cells spheroids

Polydimethylsiloxane

**Área de concentração:** Engenharia Química

**Titulação:** Doutora em Engenharia Química

**Banca examinadora:**

Lucimara Gaziola de la Torre [Orientador]

Caroline Casagrande Sipoli

Carolina Palma Naveira Cotta

Marimélia Aparecida Porcionatto

Juliano Coelho da Silveira

**Data de defesa:** 17-12-2021

**Programa de Pós-Graduação:** Engenharia Química

**Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)**

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-0047-838>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/1613170197724395>

Folha de Aprovação da Defesa de Tese de Doutorado defendida por **FRANCIELE FLORES VIT**, aprovada em 17 de dezembro de 2021, pela banca examinadora constituída pelos seguintes doutores:

Profa. Dra. Lucimara Gaziola de La Torre - Presidente e Orientadora

Faculdade de Engenharia Química- UNICAMP

Videoconferência

Dr. Juliano Coelho da Silveira

Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos -USP Pirassununga

Videoconferência

Dra. Marimelia Aparecida Porcionatto

Escola Paulista de Medicina-UNIFESP

Videoconferência

Dra. Caroline Casagrande Sipoli

Faculdade de Engenharia Química - UTFPR

Videoconferência

Dra. Carolina Palma Naveira Cotta

Escola de Engenharia da Universidade Federal do Rio de Janeiro-UFRJ

Videoconferência

ATA DA Defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no  
SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Unidade

*“A humanidade certamente necessita de pessoas práticas, que obtêm o máximo de seu trabalho sem esquecer do bem geral. Contudo, a humanidade necessita também dos sonhadores, para quem, o desenvolvimento desinteressado de um empreendimento, é tão cativante que lhes torna impossível cuidar apenas dos seus interesses pessoais.”*

Marie Curie (1867-1934)

*Para a Silvana, que sempre instigou a minha  
curiosidade e fez o impossível para realizar meus  
sonhos.*

## **AGRADECIMENTOS**

A minha família, minha mãe Silvana que sempre esteve no meu lado, que foi meu alicerce nos momentos mais difíceis e por todo sacrifícios realizados para que eu pudesse estar aqui. Aos meus irmãos Charlene e Matheus pelas risadas, as conversas, e todo o apoio emocional e sempre me estimularam a buscar meus sonhos;

Aos meus orientadores, a professora Dra. Lucimara Gaziola de la Torre e Dr Hernandez F de Carvalho, por terem me confiado essa tarefa, por não terem medido esforços para a realização desse projeto, e por todo o estímulo e ajuda;

Ao laboratório de Eletroforese Capilar e Microssistemas de Análise coordenado pelo professor Dr. José Alberto Fracassi, que disponibilizou a impressora a laser de CO<sub>2</sub>, para a construção dos dispositivos em PDMS laminado;

Ao Professor Erik Fujiwara e a aluna Yu Tzu Wu, pelo auxílio na análise de imagem;

Aos pesquisadores do laboratórios do LNNANO/CNPEM pela construção dos microdispositivos análise de microscopia de varredura e análise de XPS;

Ao laboratórios LANBDA e Hernandez Carvalho por todo o auxílio prestado, desde equipamento, treinamento e suporte técnico. Também gostaria de agradecer ao Laboratório de Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos (LDPB) em especial ao Gilson Maia pelo suporte de sempre;

Aos amigos que fiz ao longo do doutorado, parceiros de laboratório e aos amigos de longa data, que sempre estiveram presentes (mesmo alguns a distância) e tornaram toda a jornada muito mais fácil.

Agradeço a todos os funcionários da FEQ/UNICAMP pelo suporte a pesquisa.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 bolsa 88882.3296884/2019-01

A todos, muito obrigada!

## RESUMO

O câncer é um problema de saúde mundial. Devido à complexidade e alta variabilidade entre os pacientes, os medicamentos atualmente utilizados são em muitos casos ineficientes, causando resistência das células ao tratamento sem propiciar ação esperada. Assim, muitos esforços estão direcionados ao desenvolvimento de novos fármacos, estima-se que o custo para o desenvolvimento de novos fármacos é na faixa de 2,5 bilhões de dólares por ano. Uma estratégia adotada para melhorar a eficácia dos tratamentos é a utilização de combinações de medicamentos já existentes. Para se alcançar a máxima eficiência, as combinações deveriam ser estudadas e avaliadas para cada paciente em direção a uma nova tendência denominada medicina personalizada. Dentro deste âmbito, a microfluídica emerge como uma plataforma tecnológica promissora para agilizar ensaios pré-clínicos de novos fármacos e também viabilizar o estudo individualizado de cada paciente. Microfluídica é uma área multidisciplinar que opera em dispositivos em escala micrométrica e trabalha com pequenas quantidades de fluidos. Neste contexto, o presente projeto teve por objetivo o desenvolvimento de um novo microdispositivo, reutilizável e reversível para avaliação do efeito de fármacos em células tumorais. O microdispositivo foi fabricado de polidimetilsiloxano laminado, que lhe confere reversibilidade funcionalidade. Além disso, o microdispositivo é reutilizável diminuindo os custos na fabricação do microdispositivo. O microdispositivo tem a capacidade de gerar gradiente de concentração difusivo, gerando 6 diferentes concentrações de fármacos simultaneamente e ainda permite utilizar dois fármacos simultaneamente, aumentando a eficiência na aquisição de informações do comportamento celular. Como prova de conceito, foram utilizadas células de câncer de mama (MCF-7) e dois quimioterápicos (doxorubicina e paclitaxel). As células foram cultivadas na conformação 3D (isoladas e no formato de esferoides), nas quais foi possível observar as respostas bioquímicas em diferentes concentrações de quimioterápicos. Os resultados obtidos nos ensaios utilizando um ou dois fármacos foram muito próximos aos resultados encontrados em ensaios *in vivo*. A análise de viabilidade e morfologia apresentaram resultados bem próximo aos cultivos realizados em placas. Para avaliar a eficácia dos fármacos nas células, foi realizado o ensaio para quantificar a presença da enzima *lactato desidrogenase*-LDH. A reação entre a enzima e o reagente enzimático foi realizada no microdispositivo e por meio do método tradicional. Os resultados obtidos foram comparados com curva analítica de LDH. O microdispositivo é inovador, totalmente nacional, contribuindo principalmente para a criação de novas tecnologias nacionais que permitam auxiliar no desenvolvimento de novos fármacos e na escolha de tratamentos adequados e personalizáveis.

**Palavras –chaves:** microfluídica, fármacos, câncer, células 3D, *drug screening*, gradiente de concentração

## ABSTRACT

Cancer is a global health problem and due to the complexity and high variability among patients, the drugs currently used are in many cases inefficient, causing cell resistance (MRD) to the treatment without providing the expected action. Thus, many efforts are directed towards the development of new drugs, it is estimated that the cost for the development of new drugs is in the range of 2.5 billion dollars per year. One strategy adopted to improve the effectiveness of treatments is the use of existing drug combinations. To achieve maximum efficiency, combinations should be studied and evaluated for each patient towards a new trend called personalized medicine. Therefore, microfluidics emerges as a promising technological platform to streamline preclinical trials of new drugs and enable each patient's individualized study. Microfluidics is a multidisciplinary area that operates on micrometric scale devices and works with small amounts of fluids. In this context, this project aimed to develop a new microfluidic device for evaluating the effect of drugs on tumor cells. The microdevice was built in laminated polydimethylsiloxane, which confers reversibility to the microdevice. The microdevice can be disassembled and assembled without losing its functionality. In addition, the microdevice can be reusable, decreasing the cost of manufacturing the microdevice. It is a microdevice capable of generating a diffusive concentration gradient, generating different simultaneous concentrations of drugs (6 concentrations). The microdevice also allows the use of two drugs simultaneously, increasing the efficiency in the acquisition of cellular behavior information. As proof of concept, breast cancer cells (MCF-7) and two conventional chemotherapeutics (doxorubicin and paclitaxel) were used. Cells were cultured in 3D conformation (isolated and in spheroid conformation), in which it was possible to observe the biochemical responses at different concentrations of chemotherapeutics. Results obtained in trials using one or two drugs were similar to results *in vivo* trials. The analysis of viability and morphology also showed results similar to cultures carried out in plates. To assess the effectiveness of drugs in cells, the lactate dehydrogenase-LDH assay was performed. The reaction between the enzyme and the enzymatic reagent was carried out in the microdevice and in the traditional way, and the results obtained were compared with the analytical curve of LDH. The microdevice is innovative, totally national, contributing mainly to the creation of new national technologies that help in the development of new drugs and the choice of adequate and customizable treatments.

**Keywords:** microfluidics, drugs, cancer, 3D cells, drug screening, concentration gradient generator

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Incidência de câncer mundial, combinando homens e mulheres. Taxa padrão por idade a cada 100 mil pessoas. Dados referentes ao ano de 2018. Fonte: Globocan-International Agency for Research of Cancer. <https://gco.iarc.fr/today/home>. ..... 37
- Figura 2: Diferenças entre as culturas de células 2D e 3D. (A) células cultivadas em cultura 2D adotam uma morfologia planar cobrindo principalmente o plano x-y e tem uma altura reduzida no plano z. (B) no caso de cultivo 3D, as células estão envoltas em uma matriz extracelular, em alguns casos, a morfologia pode ainda adotar uma forma mais esférica (esferoides), crescendo de forma uniforme nos planos x-y e z. FONTE: ADAPTADO DE GUPTA et al (2016) ..... 40
- Figura 3: Esquema de formação de esferoide por agregação por gota. FONTE: ADAPTADO DE RYU, LEE, PARK (2019). ..... 41
- Figura 4: Método de agregação forçada para a formação de esferoides, onde ocorre uma modificação química ou física na da superfície da placa, para evitar a adesão das células. FONTE: ADAPTADO DE TSAI ET AL (2021). ..... 42
- Figura 5 : Sistema *scaffolds* para a formação de esferoides. Consiste em uma rede de fibras de hidrogéis como colágeno, laminina, alginato, que permite que as células fiquem mais próxima uma das outra. Dessa forma, proporciona uma maior interação e a formação de esferoides. FONTE: ADAPTADO DE EDMONDSON et al (2014). ..... 43
- Figura 6: Exemplo de dispositivo microfluídico. FONTE: AGENCY FOR SCIENCE TECHNOLOGY AND RESEARCH SINGAPORE (2017). ..... 45
- Figura 7: Sequência de fabricação de um dispositivo utilizando a técnica de moldagem de replica. (A) Fabricação do molde. (B) Fabricação do dispositivo, após a construção do molde. FONTE: LIN, PAN & WU. (2011). Imagem reproduzida sob a autorização da Elsevier. .. 47
- Figura 8: Esquema do processo de ablação a laser CO<sub>2</sub> utilizando método de feixe de laser focado FONTE: HONG (2010). Imagem reproduzida sob a autorização da Springer Nature. .... 49
- Figura 9: Esquema da impressão 3D de um canal microfluídico, modelos 3D de estruturas autossustentadas, incluindo canal triangular, canal circular, cúpula hexagonal e cúpula cônica. FONTE SU et al (2020). Imagem reproduzida sob a autorização da Science Advances. .... 50
- Figura 10: Dispositivos microfluídicos com geração de gradiente. (A) Difusivo bidimensional FONTE: ATENCIA et al (2009). (B) Convectivo. Esse modelo é denominado “árvore de natal”, uma vez que cria um gradiente de concentração uniforme. FONTE OLIVEIRA et al

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| (2016b) imagem a, reproduzida sob a autorização da Royal Society of Chemistry. Imagem b, reproduzida sob a autorização da John Wiley and Sons.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 54 |
| Figura 11: (A) Diferentes abordagens de sistema de co-culturas, para o estudo de comunicação celular: i) A co-cultura celular no mesmo microambiente, sendo a comunicação primordialmente por contato direto; ii) A co-cultura semi-separada oferece comunicação bidirecional e sem contato; iii) A transferência do meio condicionado oferece comunicação unidirecional e sem contato. (B) desenho do microdispositivo (C) o diagrama esquemático do funcionamento do microdispositivo onde, diferentes tipos de células foram cultivadas nas microcâmaras, fixadas com matriz extracelular. As setas pretas mostram as direções de fluxo do meio de cultura de uma microcâmara para outra. As entradas de bloqueio de sinal (em zigue-zague) estão próximas, ao fluxo de meio, facilitando a neutralização de um sinal específico. (D) Detalhe do funcionamento do microdispositivo de comunicação unidirecional. (E) diagrama esquemático do sistema de bloqueio de sinal. FONTE: FANG et al (2021). Imagem reproduzida sob a autorização da Elsevier..... | 56 |
| Figura 12: Dispositivo construído em hidroxiapatita (HA)e polidimetilsiloxano (PDMS), com gradiente concentração convectivo modelo “árvore de natal”. O microdispositivo contém 6 canais. Neste caso, cada canal é responsável por alimentar uma câmara de cultivo. FONTE: TANG ET AL (2021). Imagem reproduzida sob a autorização da Elsevier. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 57 |
| Figura 13: (A) Diagrama esquemático da montagem microdispositivo para gerar o gradiente de rigidez em um hidrogel de PAA. (B) Comportamento das células U87-MG cultivadas em diferentes regiões de rigidez sob estimulação do gradiente EGF (C) Fotografia do dispositivo microfluídico fabricado. FONTE DOU et al. (2020). Imagem reproduzida sob a autorização da ACS Publication. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 58 |
| Figura 14: (A) Dispositivo para células 2D com gradiente de concentração convectivo, (B) Geração do gradiente nas diferentes câmaras de cultivo. FONTE: HUNG et al (2005). Imagem reproduzida sob a autorização da JohnWiley and Sons. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 60 |
| Figura 15:Dispositivos microfluídicos para triagem de fármacos. Microdispositivo utilizado para <i>screening</i> de dois fármacos, utilizando como ferramenta um gradiente de concentração convectivo. FONTE SUN et al (2017). Imagem reproduzida sob a autorização da Springer Nature.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 61 |
| Figura 16:Dispositivo para cultivo de co-culturas celulares na conformação 3D com geração de gradiente convectivo O dispositivo dispõe de uma entrada para fármaco, conectada a três canais que geram um gradiente convectivo nas câmaras de cultivo. As câmaras de cultivos foram construídas em triplicatas, e possuem uma saída para cada conjunto de câmaras.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |    |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Conectada em paralelo a essas câmaras, há canais responsáveis por levar as células até as câmaras e o meio de cultivo. FONTE: XU et al (2013). Imagem reproduzida sob a autorização da Elsevier.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 62 |
| Figura 17:Dispositivo para estudo <i>single cell 3D</i> , para estudo de respostas bioquímicas a uma concentração e fármaco FONTE: ZHANG et al (2016). Imagem reproduzida sob a autorização da Royal Society of Chemistry. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 63 |
| Figura 18: Diagrama esquemático do microdispositivo com as diferentes camadas de dispersão de fármacos, construída de PMMA.FONTE LI et al (2021). ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 64 |
| Figura 19: Diagrama do funcionamento do microdispositivo: (a) Design de chips. O microchip permite utilizar 16 seringas no total, nesse caso foram utilizadas amostras aquosas, conectadas às entradas no microchip por meio dos microcanais. O display braille é usado para controlar as válvulas (círculos vermelhos) e regular o fluxo proveniente das seringas de fase aquosa, resultando em diferentes combinações. Os plugues são coletados em um tubo conectado à saída. (b) Configuração experimental do microchip em um display Braille alinhando os canais microfluídicos com as válvulas braille. FONTE: EDUATTI et al (2018). Imagem reproduzida sob a autorização da Royal Society of Chemistry.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 64 |
| Figura 20:Número de publicações de trabalhos envolvendo o desenvolvimento dos OoCs ao longo dos anos. FONTE (ZHANG; RADISIC, 2017). Reproduzido sob a autorização Royal Society of Chemistry.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 65 |
| Figura 21:Pulmão on a chip, microdispositivo que mimetiza a respiração humana. (A) O microfabricado em PDMS, contendo microcanais compartimentados para formar a barreira alveolar-capilar, ente os canais há uma membrana flexível e porosa de PDMS, revestida com matriz extracelular. (B) Ilustração demonstrando o processo de inalação, como que ocorre nos pulmões, as contrações do diafragma causam uma redução na pressão intrapleural, levando à distensão dos alvéolos e alongamento da interface alvéolo-capilar. (C) Três camadas de PDMS são alinhadas e irreversivelmente ligadas para formar dois conjuntos de três microcanais paralelos separados por uma membrana de PDMS de espessura de 10 mm. Barra de escala, 200 mm. (D) Após a ligação permanente, é aplicado um sistema de vácuo, onde a membrana entre canais, sofre um estiramento mecânico. Barra de escala, 200 mm. (E) Vista superior do dispositivo microfluídico. (F) Diagrama esquemático do sistema Air on a chip”, após a inoculação do vírus. FONTES Imagens A-E, HUH et al (2010) e Imagem F, SI et al (2021). Imagem A-E reproduzido sob a autorização de AAAS Imagem I reproduzido sob a autorização Springer Nature. .... | 66 |

Figura 22:Plataforma heart-on-a-chip. (a) (superior) Imagem óptica e esquema (inferior) ilustração do chip totalmente montado com todos os elementos integrados, eletrodo de referência e canal em PDMS. (b) Imagem óptica representativa de um elemento extracelular revestido com platina em preto (seta vermelha). (c) Imagem óptica representativa de um elemento de gravação intracelular fabricado em ouro contendo cinco nanopilares verticais em platinas verticais (seta azul). (d) (topo) Detalhe em MEV dos cinco nanopilares verticais (inferior) Seção transversal de um único nanopilar. FONTE LIU et al (2020). Imagem reproduzida sob a autorização ACS Publications..... 68

Figura 23: Diagrama esquemático da construção do microdispositivo. (A); Utilização da técnica de ablação a laser de CO<sub>2</sub>, para cortar a geometria dos canais e das paredes das câmaras de cultivo (em PDMS<sub>LAM</sub>). A tampa no qual as mangueiras são acopladas foram furadas com furadeira rotativa modelo Dremel. (C) Desenho das partes do microdispositivo dividido em Região Superior (tampa e microcanais) e Região inferior ( parede e base das microcâmaras de cultivo), imagem do microdispositivo totalmente montado. .... 74

Figura 24:Diagrama esquemático do microdispositivo; (A) Microdispositivo separa por andares. No andar superior contém os canais, cada um contendo duas entradas e duas saídas. Os canais são responsáveis por levar nutrientes e fármacos até as células. As células por sua vez, estão situadas no andar inferior, onde contém as microcâmaras, onde as células foram inoculadas e os poços, que ficam exatamente na saída dos canais. (B) Vista lateral dos poços. Nos poços são adicionados os reagentes, que irão reagir com um ou mais metabolitos excretados pelas células..... 76

Figura 25: Esquema do cultivo celular em microdispositivo. Primeiramente as células são cultivadas em garrafas próprias para culturas de células, onde após atingir 80% de confluência (80% da área da garrafa), são retiradas com auxílio de tripsina, centrifugadas, contadas em câmara de Neubauer e então, resuspendidas e inoculadas manualmente com auxílio de micropipeta nas microcâmaras de cultivo. Após, o microdispositivo é totalmente vedado e preenchido os canais com meio de cultivo. Todo o processo de inoculação é realizado em fluxo laminar estéril. O microdispositivo então é incubado a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> e umidade controlada..... 79

Figura 26:Formação dos esferoides. (A) Cultivo das células de MCF-7 em placas, até atingir a confluência de 80%; (B) As células são tripsinizadas e centrifugadas, retirando o sobrenadante; (C) Uma alíquota contendo 60.000 células foi resuspendida em 340µL de meio RPMI +170 µL de Matrigel®; (D) São adicionadas 55 µL da solução contendo células +matriz em placas de vidro, em forma de gotas e incubadas a 37°C por 1h, para polimerizar

a matriz;(E) Após a polimerização da matriz, foram adicionados 250 µL de meio RPMI e incubado por 24h,o meio foi trocado cada 24h; (F) após a formação dos esferoides (~5 dias), é realizada a quebra da matriz, utilizando a enzima Dispase II(0,01%- 100 µL) por 30 min, a 37°C; (G) Para neutralizar a ação a enzima após 30 min, foi adicionado 100 µL de uma solução contendo DPS +Soro feral bovino (1%) e centrifugado os esferoides por 5 min a 150 RPM; (H) Após a centrifugação, foi retirado o sobrenadante e os esferoides foram resuspensos cuidadosamente em um solução contendo 100 µL de Matrigel® + 100 µL de agarose (1%) + 100 µL de meio RPMI; (I) Foi adicionado 4 µL da solução contendo os esferoides em cada uma das câmaras de cultivo, o microdispositivo foi totalmente vedado e levado a incubadora por 60 min a 37°C, após esse período, foi bombeado 4 µL de meio RPMI de cultivo para cada uma das microcâmaras e incubado novamente o microdispositivo, por 5 dias e o meio foi trocado a cada 24 h. .... 81

Figura 27: Diagrama ilustrativo do ensaio da geração do gradiente difusivo com dois fármacos simultâneos. As células foram inoculadas manualmente (450 células por câmara), com Matrigel® +agarose. Após a polimerização da matriz, foi bombeado em uma das entradas o fármaco DOX e na outra PXT por 3h., juntamente ao ensaio foi realizado o controle, utilizando a mesma quantidade de células, onde foi bombeado apenas meio de cultivo (RPMI) por 3h. Durante todo o ensaio, foram obtidas imagens das câmaras de cultivo no intervalo de 30 min..... 85

Figura 28: Diagrama ilustrativo do ensaio da ação dos s fármacos em esferoides. Os esferoides após de formados, foram inoculados manualmente, com Matrigel® +agarose nas câmaras de cultivo. Após a polimerização da matriz, foi bombeado nas duas entradas o fármaco DOX em um dos módulos e nas entradas do outro módulo PXT por 3h. Vale ressaltar que para o ensaio com os ambos fármacos, não houve a geração do gradiente difusivo de concentração. Durante todo o ensaio, foram obtidas imagens das câmaras de cultivo no intervalo de 30 min. .... 86

Figura 29: Diagrama ilustrativo do ensaio da ação dos s fármacos combinados em esferoides. Os esferoides após de formados, foram inoculados manualmente, com Matrigel® +agarose nas câmaras de cultivo. Após a polimerização da matriz, foi bombeado nas duas entradas os fármacos DOX e PXT, previamente misturados na mesma seringa. O ensaio foi realizado por 180 min. Vale ressaltar que para o ensaio com os ambos fármacos, não houve a geração do gradiente difusivo de concentração. Durante todo o ensaio, foram obtidas imagens das câmaras de cultivo no intervalo de 30 min..... 87

Figura 30:Diagrama esquemático da diferença dos dois métodos de coleta. (A) A coleta é realizada por meio de mangueiras acopladas nas saídas dos canais e tubos plásticos (*eppendorfs*). As enzimas são coletadas em intervalo de 60 min e adicionadas em placas de 96, ao final do processo (180 min), é adicionado o reagente nos poços juntamente com a enzima e levado ao leitor de placas para ler a absorbância das amostras. (B) Na nova técnica empregada, o reagente é adicionado aos poços, permitindo que a medida que a célula libere lactato, já ocorra a reação dentro dos poços. Os poços são esvaziados a cada 60 min e ao final do processo, e efetuada a leitura da absorbância e leitor de placas. (C) Diagrama da reação da enzima lactato desidrogenase com o reagente. Quanto maior a liberação de lactato, maior será o valor de absorbância. A leitura de absorbância é realizada em leitor de placa na faixa de 490-680 nm..... 89

Figura 31:Diagrama esquemático operacional do microdispositivo, o microdispositivo possui 4 módulos que permite realizar 4 ensaios em diferentes condições, gerando um gradiente difusivo de concentração (câmaras de cultivo em cada condição experimental - sextuplicatas). (A) Condições experimentais investigadas, onde em um dos módulos foi testado o fármaco individualmente, após dois fármacos (um em cada entrada) e o controle, de forma simultânea. (B) Esquema da ilustrativo demonstrando as partes do microdispositivo responsável pela geração do gradiente. O microdispositivo possui 6 câmaras de cultivo por módulo, onde as células são inoculadas e para cada módulo dois canais, responsáveis por suprir as microcâmaras com meio e/ou fármacos. Cada conjunto de canais possuem duas entradas e duas saídas. Para todo o experimento foi utilizada uma vazão de  $7 \mu\text{L}.\text{min}^{-1}$ , a  $37^{\circ}\text{C}$ . ..... 92

Figura 32: Espectros XPS obtidos para amostras retangulares (2 mm x 2mm) dos materiais, previamente limpas e submetidas a vácuo: PDMS convencional (em azul) e PDMS<sub>LAM</sub> (laminado, em vermelho). Imagem reproduzida sob a autorização da Elsevier..... 100

Figura 33:Morfologia das superfícies dos materiais obtidas em microscopia eletrônica de varredura (MEV) e sob mesma magnificação. (A) Superfície do PDMS<sub>LAM</sub>, apresenta ranhuras uniformes (grooves – círculo em vermelho) ao longo de toda a superfície do material. (B) Superfície do PDMS convencional mostra-se lisa sem ranhuras. Imagens 3D da superfície do material tratadas no software ImageJ (3D surface plot) -(C) PDMS<sub>LAM</sub> e (D) PDMS convencional. Imagem reproduzida sob a autorização da Elsevier. .... 102

Figura 34:Perfil da dilatação do elastômero com o aumento da temperatura (amostras cortadas em quadrados de 2 x 2 mm). As amostras foram expostas a cada uma das temperaturas por 20

min e então resfriadas à temperatura ambiente. Em seguida, as dimensões foram novamente avaliadas. Imagem reproduzida sob a autorização da Elsevier. .... 104

Figura 35: Diagrama esquemático do microdispositivo reversível., incluindo a etapa de montagem:

(A) Partes integrantes do microdispositivo, composto por: (i) tampa de vidro composta orifícios para conexão de mangueiras, que permitem o bombeamento de fluidos até os canais de laterais e a coleta na outra extremidade; (ii) microcanais laterais, construído em PDMS<sub>LAM</sub> (são 4 módulos independentes que permitem experimentos em paralelo – cada módulo possui duas entradas e duas saídas); (iii) unidade construída em PDMS<sub>LAM</sub>, e que constitui as paredes das câmaras de cultivo. Em cada módulo, existe 6 microcâmaras que permitem replicar os experimentos; (iv) base da câmara de cultivo, em vidro; (B) Etapa1: É montada a parte inferior, contendo a base e as câmaras de cultivo e logo, são inoculadas as células nas câmaras de cultivo. (C) A Etapa 2: consiste em juntamente com a parte inferior, adicionar a parte superior contendo os microcanais e a tampa, após de montado o microdispositivo preenchido com meio e incubado a 37°C.; (D) Etapa 3: Após 24 h, o microdispositivo está pronto para o ensaio com fármaco, (E) Imagem do microdispositivo completamente montado. Imagem reproduzida sob a autorização da Elsevier. .... 106

Figura 36: Esquema ilustrativo do perfil de concentração dentro da câmara de cultivo: (A) (i)

Diagrama esquemático ilustrando a formação do gradiente de concentração, a partir da alimentação simultânea nas duas correntes laterais com doxorubicina e meio de cultura (DOX-0.025 mg.mL<sup>-1</sup>+RPMI) e meio de cultura (RPMI) ; (ii) Projeção de uma das câmaras de cultivo, indicando a subdivisão virtual em linhas (1-6) e colunas (A-F); (B) Imagem da câmara de cultivo após 45 min, com a divisão em linhas e colunas; (C) Perfil de intensidade de fluorescência ao longo das linhas virtuais. O experimento foi realizado durante 60 min, mantendo-se vazão constante e igual a 7 µL.min<sup>-1</sup> em ambas as correntes laterais. Imagem reproduzida sob a autorização da Elsevier. .... 109

Figura 37: (A) Perfil do crescimento celular ao longo do tempo. A curva em vermelho

corresponde ao cultivo em placas e a curva em preto ao cultivo em microdispositivo, tendo sido calculada a velocidade específica de crescimento celular  $\mu_x$  para ambos os cultivos (poço e em câmara de cultivo). (B) Viabilidade celular do cultivo em placas (azul) e em microdispositivo (roxo). A ANOVA para os cultivos não apresentaram diferenças estatísticas para um intervalo de confiança de 95 %. As células foram cultivadas durante 72 h (3Dias) na concentração inicial de 60.000 células. mL<sup>-1</sup>. O meio RPMI utilizado foi trocado a cada 24 h. (C) Imagem da viabilidade celular em diferentes tempos, em câmara de cultivo

- e poços (escala de 50 $\mu$ m). As imagens foram obtidas em microscopia de fluorescência com objetiva de 20x. Imagem reproduzida sob a autorização da Elsevier..... 113
- Figura 38:(A) Diagrama esquemático do microdispositivo, apresentando as 6 câmaras de cultivo. Em uma das entradas foi escoada a DOX (0,025 mg.mL<sup>-1</sup>) + RPMI e, na outra entrada, meio RPMI. (B) Vista transversal da câmara de cultivo, onde o gradiente de concentração foi formado. (C) Imagens das células MCF-7 no interior das câmaras de cultivo em diferentes tempos (0, 120 e 180 min). As células foram marcadas com marcador Calceína-AM e foi utilizada microscopia de fluorescência. Foram utilizados os filtros de contraste de fases e Alexa fluore (550nm) at 10x magnification. Imagens obtidas por microscopia óptica, utilizando-se contraste de fase e objetiva de magnificação de 10x. Imagem reproduzida sob a autorização da Elsevier..... 117
- Figura 39:Perfil do crescimento celular nas câmaras de cultivo ao longo do tempo: (A) Perfil do comportamento celular frente a diferentes concentrações de DOX ao longo de 180 min; (B) Perfil do número de células obtido na ausência de DOX (controle); (C) Perfil da cinética celular nas diferentes concentrações de DOX em função do tempo; (D) Perfil da queda da viabilidade celular após 180 min, em função da concentração de DOX. As células foram contadas em cada quadrante, e as análises foram realizadas em triplicata. Imagem reproduzida sob a autorização da Elsevier. .... 119
- Figura 40:Concentração da enzima lactato desidrogenase ao longo de 3 h. O ensaio foi conduzido por meio de uma reação enzimática que quantifica a presença desta enzima no meio. As barras em preto representam o controle (branco), no qual as células não passaram por nenhum tratamento, e as barras em roxo representam as células após do tratamento com a DOX. Imagem reproduzida sob a autorização da Elsevier..... 121
- Figura 41: (A) Imagem das células presentes nas câmaras de cultivo sem o tratamento com DOX (controle). Escala = 40  $\mu$ m. (B) Células tratadas com 0,025 mg. mL<sup>-1</sup> de DOX durante 180 min (C) Ampliação da célula sem tratamento. Barra de escala = 5  $\mu$ m. (D) Ampliação da célula tratada com DOX (0,025 mg.mL<sup>-1</sup>) após 180 min. Barra de escala = 10  $\mu$ m. As flechas em branco, representam as microvilosidades presentes nas células. Imagem reproduzida sob a autorização da Elsevier..... 123
- Figura 42:Perfil da viabilidade celular na presença dos fármacos doxorubicina e paclitaxel em microdispositivo (normalizado pelo número inicial N<sub>0</sub>) para diferentes tempos. Foram testados em microdispositivos os fármacos doxorubicina (DOX) + o controle (células sem a presença de fármaco) (A) e paclitaxel (PXT+ controle (B) As análises foram realizadas em triplicatas, sem a geração de gradiente de concentração. Perfil da queda da viabilidade celular

após 180 min em função da concentração dos fármacos: (C) DOX e (D) PXT. Para todos os ensaios, foi utilizado o marcador *Live and Dead*, as células foram suplementadas com meio RPMI, incubadas na temperatura de 37°C, em atmosfera controlada contendo 5 % de CO<sub>2</sub>. Para todas as análises foram realizadas análise estatística ANOVA com um intervalo de confiança de P<0,05. .... 131

Figura 43: Esquema do ensaio de morte celular ocasionada pelo fármaco (DOX). As células foram inoculadas manualmente nas câmaras de cultivo (450 células) juntamente com Matrigel®+agarose, para minimizar o contato célula-célula. Após a polimerização do gel (cerca de 4 h), foi gerado o gradiente de DOX, como já realizado nos ensaios anteriores, no entanto após 60 min, foi interrompido o suprimento de DOX e o restante do tempo (120min) foi apenas bombeado meio de cultivo (RPMI). Foram obtidas imagens ao longo do ensaio (180 min) a cada 30 min, em microscopia automatizada de fluorescência. .... 134

Figura 44:Efeito da interrupção de DOX dentro das microcâmaras; (A) Células suplementadas com DOX por apenas 60 min. Após 60 min, suspendeu-se o tratamento com DOX e as células foram suplementadas apenas com meio RPMI por 120min. Imagem nos tempos 60 min e 180 min. (B) Perfil da viabilidade celular nos tempos 60 min e 180 min, ANOVA com  $p > 0,05$ . As células foram mantidas na temperatura de 37°C ao longo do experimento (180 min). .... 135

Figura 45:Microscopias de fluorescência das células MCF-7 nas microcâmaras de cultivo em diferentes tempos e na presença de gradiente de concentração para doxorubicina (A) e paclitaxel (B). Em cada caso, em uma das entradas foi bombeada apenas meio de cultivo (RPMI) e na outra o fármaco (DOX ou PXT) em meio. (A) DOX, concentração em uma das entradas foi 0,025 mg.mL<sup>-1</sup> e (B) PXT, concentração em uma das entradas 0,015 mg.mL<sup>-1</sup>. Utilizou-se cerca de 450 células por câmara de cultivo. O ensaio foi realizado em triplicata por 180 min. Imagens obtidas com objetivas de 20X, barra de escala de 500µm. .... 137

Figura 46:Perfil da viabilidade células em diferentes tempos com diferentes concentrações de fármacos (A) PXT e (B) DOX. Para ambos os fármacos, em uma das entradas foi bombeada apenas meio de cultivo (RPMI) e na outra o fármaco diluído em meio. A concentração de células foi de ~450 células por câmara de cultivo. O ensaio foi realizado em triplicata por 180 min. As imagens foram obtidas em microscopia de fluorescência a 37 °C, CO<sub>2</sub> e umidade controlada. (C) perfil da liberação da enzima lactato desidrogenase ao longo de 180 min, onde foram coletadas amostras para cada experimento no intervalo de 60 min (1h). .... 138

Figura 47: Análise do gradiente formado por dois fármacos. Foram utilizados o fármaco DOX (0,025 mg.mL<sup>-1</sup>) e o fluoróforo FITC (0,015 mg.mL<sup>-1</sup>), na mesma concentração do fármaco

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| PXT. (A) Diagrama esquemático do gradiente formado dentro das microcâmaras. As microcâmaras foram subdivididas em câmaras virtuais em linhas (1-6) e colunas (A-F).                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 141 |
| Figura 48: (A) Perfil da dose responsiva para obter o IC <sub>50</sub> para cada um dos fármacos testados (DOX e PXT) e (B) Representação gráfica dos efeitos combinados (isobolograma) baseado no IC <sub>50</sub> de cada um dos fármacos. A área denominada SG, compreende as concentrações de fármaco que quando combinado, possuem o efeito sinérgico, AD, é onde o princípio de ação individual e combinados são os mesmos, efeito aditivo e a área denominada AG, o efeito antagônico, é a área que as concentrações de cada um dos fármacos se anulam ou não surte nenhum efeito. | 143 |
| Figura 49: Viabilidade celular ao longo de 180 min, utilizando gradiente de concentração duplo (DOX e PXT). O ensaio foi realizado por 180 min, com vazão constante de 7µL.min <sup>-1</sup> . (A) As células com fluorescência em vermelho, representam as células não viáveis e em verde as células viáveis. (B) Perfil da distribuição da viabilidade das células para cada uma das concentrações geradas nos diferentes tempos.                                                                                                                                                       | 145 |
| Figura 50: Viabilidade celular ao longo de 180 min, utilizando o gradiente de concentração duplo (DOX e PXT). O ensaio foi realizado por 180 min, com vazão constante de 7µL.min <sup>-1</sup> . (A) As células com fluorescência em vermelho, representam as células não viáveis e em verde as células viáveis. (B) Perfil da distribuição da viabilidade das células para cada uma das concentrações geradas nos diferentes tempos.                                                                                                                                                     | 146 |
| Figura 51: Viabilidade celular ao longo de 180 min, utilizando o gradiente de concentração duplo (DOX e PXT). O ensaio foi realizado por 180 min, com vazão constante de 7µL.min <sup>-1</sup> . (A) As células com fluorescência em vermelho, representam as células não viáveis e em verde as células viáveis. (B) Perfil da distribuição da viabilidade das células para cada uma das concentrações geradas nos diferentes tempos.                                                                                                                                                     | 147 |
| Figura 52: Análise da eficácia das combinações e fármaco ao longo do tempo (A) Análise indireta utilizando o método de quantificação da enzima lactato desidrogenase (LDH) ao longo de 180 min para cada ensaio realizado (B) Análise do mecanismo de morte celular, dividindo as células em: viáveis, apoptóticas e necrosadas. Foi utilizado o marcador Anexina V/PI ao final dos ensaios (180 min). (*) significam diferenças estatísticas entre as amostras (ANOVA p<0,05).                                                                                                           | 148 |
| Figura 53: Imagem dos poços após a reação da fenoltaleína com hidróxido de potássio (0,01M). (A) tempo 10 min, (B) tempo 40 min. Durante todo o ensaio (40 min) a vazão foi mantida constante de 7 uL.min <sup>-1</sup> . Foi observado a mudança da tonalidade com o aumento da concentração de hidróxido de potássio. Por meio do software ImageJ, foi possível                                                                                                                                                                                                                         |     |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| correlacionar o aumento da concentração com a mudança de tonalidade. Nota-se pelo perfil presente (C), que o aumento da intensidade em escala de cinza é diretamente proporcional ao aumento da concentração de hidróxido de potássio ao longo do tempo, sendo possível avaliar essas mudanças em tempo real. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 156 |
| Figura 54: Esferoides após 5 dias mantidos nas microcâmaras. (A) Distribuição de tamanhos dos esferoides na câmara de cultivo presentes na estrutura 3D (Matrigel® +agarose). Barra de escala de 500 µm;(B) Imunocitoquímica dos esferoides, utilizando os marcadores DAPI (azul) para núcleo e faloídina (vermelho) para citoesqueleto. Imagem obtida em e microscopia confocal de fluorescência; (C) Perfil da distribuição do diâmetro médio dos esferoides, utilizando um N=120 esferoides. A partir do diâmetro médio, foi possível calcular índice de esfericidade dos esferoides (0,89) (D) Tamanho médio dos esferoides após 5 dias. Análise realizada a partir das imagens obtidas em confocal.....                                                                                                                                                                          | 158 |
| Figura 55:Análise do metabolismo celular em placas e em microdispositivo. (A) viabilidade dos esferoides ao longo de 186 h (7 dias), (B) Análise do consumo da glicose ao longo do tempo; (C) análise da liberação do lactato desidrogenase (LDH). Para todos os ensaios, foram utilizados um N= 120 esferoides. ANOVA $p<0,05$ , (*) representa diferenças significativas estatisticamente. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 159 |
| Figura 56:Perfil cinético da variação da área dos esferoides ( $A/A_0$ ) nas diferentes concentrações de fármaco. (A) DOX e (B) PXT. A corresponde a área dos esferoides no tempo (t) e $A_0$ corresponde a área inicial (t=0) dos esferoides. O ensaio foi realizado durante 180 min, a 37°C, a uma vazão constante de $7\mu\text{L}.\text{min}^{-1}$ . ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 162 |
| Figura 57:Microscopias de fluorescência dos esferoides de MCF-7 mantidos na presença de DOX ou PXT no microchip. O microchip operou com a infusão de DOX ou PXT na concentração e $0,1\text{ mg}.\text{mL}^{-1}$ . Para o controle, o microchip teve infusão apenas com meio de cultivo (RPMI). Os ensaios ocorram por 180min, a 37°C, 5 % de $\text{CO}_2$ e vazão de $7\mu\text{L}.\text{min}^{-1}$ . ...                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 164 |
| Figura 58:Avaliação da viabilidade dos esferoides na presença de PXT ou DOX ( $0,1\text{ mg}.\text{mL}^{-1}$ para cada fármaco) na prese. (A) Perfil das áreas em verde (viáveis) dos esferoides ao longo do tempo. Para quantificar, foi utilizado o marcador <i>Live and Dead</i> , avaliando apenas as áreas em verde ao longo do tempo. Os resultados obtidos em cada tempo (t), foi normalizado pela área inicial ( $A_0$ ). (B) Perímetro médio dos esferoides para cada fármaco testado. O perímetro também foi normalizado pelo perímetro inicial de cada esferoide; (C) Consumo de glicose presente no meio RPMI ( $4,5\text{ mg}.\text{mL}^{-1}$ de glicose inicial). Para esse estudo foi utilizado um N=80 esferoides, para cada fármaco testado e o ensaio foi realizado por 180 min. ANOVA $p<0,05$ não apresentou diferença estatística para as condições testadas.... | 165 |

Figura 59:Quantificação da enzima lactato desidrogenase em três diferentes condições (sem fármaco(controle), fármaco paclitaxel e doxorubicina). Os ensaios foram realizados utilizando (A) a técnica de coleta tradicional (por mangueiras) e (B) os poços presentes no microdispositivo. Foram coletando a enzima excretada pelos esferoides de MCF-7 a cada 1 h. Para a técnica utilizando mangueiras; foi coletado a enzima em tubos e adicionado o reagente, para após ser mensurado em leitores de placa (C) Curva analítica de LDH. No caso utilizado da coleta por poços, o reagente foi previamente adicionado nos poços, reagindo em tempo real com o resíduo produzido pelas células. Os valores de quantidade de enzima utilizando as duas técnicas estão representados no gráfico em U/mL (unidade de enzima por e mililitros). ANOVA  $p<0,05$ . ..... 168

Figura 60: Microscopias de fluorescência de esferoides marcados com *Live and Dead* mantidos em microchip sob perfusão na presença de 0,050 DOX + 0,025 PXT. As áreas em verde representam as células viáveis e as áreas em vermelho as células não-viáveis. Os ensaios ocorreram por 180min, a 37°C, 5 % de CO<sup>2</sup> e vazão de 7  $\mu\text{L}.\text{min}^{-1}$ . Barra de escala 100 $\mu\text{m}$ . ..... 171

Figura 61:Microscopias de fluorescência de esferoides marcados com *Live and Dead* mantidos em microchip sob perfusão na presença de 0,070 DOX + 0,025 PXT. As áreas em verde representam as células viáveis e as áreas em vermelho as células não-viáveis. Os ensaios ocorreram por 180min, a 37°C, 5 % de CO<sup>2</sup> e vazão de 7  $\mu\text{L}.\text{min}^{-1}$ . Barra de escala 100 $\mu\text{m}$ . ..... 171

Figura 62:Análise de viabilidade. (A) Perfil do número de células viáveis ao longo do tempo. Para quantificar, foi utilizado o probe *Live and Dead*, avaliando apenas as áreas em verde ao longo do tempo. Os resultados obtidos em cada tempo (t), foi normalizado pela área inicial (A<sub>0</sub>). (B) Perímetro médio dos esferoides para cada condição testada ao longo do tempo. O perímetro também foi normalizado pelo perímetro inicial de cada esferoide. Para esse estudo foi utilizado um N=60 esferoides, para cada condição testada. ANOVA  $p<0,05$  não apresentou diferença estatística para as condições testadas. .... 172

Figura 63: (A) Perfil da liberação de lactato (LDH) ;(B) Mecanismo de morte celular (apoptose/ necrose). Para esse ensaio foi utilizado o probe; AnexinaV/PI (C) Análise do consumo de glicose presente no meio de cultivo (RPMI 4,5  $\text{mg}.\text{mL}^{-1}$ ). O N para essa análise foi de 60 esferoides para cada uma das condições testadas. ANOVA  $p<0,05$  não apresentou diferença estatística entre os ensaios..... 173

## LISTA DE TABELAS

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Tabela 1: valores de viabilidade celular (%) e crescimento celular (N/N0). As células foram mensuradas por 72 h (4 dias). Para a viabilidade foi calculada a porcentagem de células viáveis ao longo do tempo e o crescimento foi normalizado (N) pelo número inicial de células (N0). .....                                           | 114 |
| Tabela 2: Concentração de <i>lactato desidrogenase</i> (LDH) liberado ao longo de 3 h. A liberação de LDH foi observada nas células tratadas com DOX e das células em tratamento.....                                                                                                                                                  | 122 |
| Tabela 3: Viabilidade celular dos esferoides (A/A0) após ao tratamento com DOX E PXT na concentração de 0,1 mg.mL <sup>-1</sup> . .....                                                                                                                                                                                                | 162 |
| Tabela 4: Análise comparativa em % da diferença de valores utilizando a técnica de coleta por tubos e utilizando a coleta diretamente dos poços, em comparação a curva analítica (controle). A Análise foi realizada para os dois fármacos nos 4 tempos (0-3h), ANOVA P<0,05 e teste de Tukey com intervalo de confiança de 95%. ..... | 169 |

## LISTA DE ABREVIATURAS

|                 |                                                       |
|-----------------|-------------------------------------------------------|
| 293T            | Human Embryonic Kidney 293                            |
| A549            | Adenocarcinomic Human Alveolar Basal Epithelial Cells |
| AD              | Ação aditiva entre dois fármacos/reagentes            |
| AG              | Ação Antagônica entre dois fármacos/reagentes         |
| Anti EpCAM      | Antibody Epithelial Cellular Adhesion Molecule        |
| Ca-SKI          | Cervical Epidermoid Carcinoma                         |
| Células 2D      | Células em duas dimensões                             |
| Células 3D      | Células em três dimensões                             |
| CHX             | Cycloheximide                                         |
| CO <sub>2</sub> | Dióxido de Carbono                                    |
| Covid 19        | Corona Virus Disease                                  |
| CTC             | Circulating Tumor Cells                               |
| DeMEA           | Detachable Microfluidic Electrochemical Aptasensor    |
| DMSO            | Dimetilsulfóxido                                      |
| DNA             | Deoxyribonucleic Acid                                 |
| DOX             | Doxorrubicina                                         |
| ECM             | Extracellular Matrix                                  |
| EDTA            | Ethylenediamine Tetraacetic Acid                      |

|        |                                                  |
|--------|--------------------------------------------------|
| EFG    | Epidermal Growth Factor                          |
| EpCAM  | Epithelial Cellular Adhesion Molecule            |
| F9     | Mouse Testicular Carcinoma                       |
| FBS    | Fetal Bovine Serum                               |
| FITC   | Fluorescein Isothiocyanate                       |
| GM-CSF | Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor |
| HA     | Hidroxiapatita                                   |
| HBT-5  | Human Bladder Tumor                              |
| HCS    | High Content Screening                           |
| HCT116 | Human Colon Tumor                                |
| HeLa   | Henrietta Lacks cells                            |
| hFOB   | Human fetal osteoblast cells                     |
| hiPSC  | Human Induced Pluripotent Stem Cell              |
| HL-1   | Heart Muscle cells                               |
| HTS    | High Throughput Screening                        |
| IC     | Índice Combinatório                              |
| INCA   | Instituto Nacional do Câncer                     |
| LDH    | Lactato desidrogenase                            |
| Luz UV | Luz Ultravioleta                                 |

|                     |                                              |
|---------------------|----------------------------------------------|
| MCF-7               | Michigan Cancer Foundation Cells             |
| MD-MB231            | Metastatic Mammary Adenocarcinoma            |
| MDR                 | Multi Drugs Resistance                       |
| MEV                 | Microscopia Eletrônica de Varredura          |
| OoaC                | Organ on a Chip                              |
| PAA                 | Poliacrilamida                               |
| PBS                 | Phosphate-Buffered Saline                    |
| PC3                 | Prostate Cancer cells                        |
| PCNA                | Proliferating Cell Nuclear Antigen           |
| PDMS                | Polidimetilsiloxano                          |
| PDMS <sub>LAM</sub> | Polidimetilsiloxano Laminado                 |
| PI                  | Propidium Iodide                             |
| PLL                 | Poli-L Lisina                                |
| PMMA                | Polimetacrilato de Metila                    |
| PXT                 | Paclitaxel                                   |
| RNA                 | Ribonucleic Acid                             |
| RPMI                | Roswell Park Memorial Institute Medium       |
| SEM                 | Scanning Electronic Microscopy               |
| SG                  | Ação Sinérgica entre dois fármacos/reagentes |

|       |                                                                                      |
|-------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| SLA   | Stereolithography                                                                    |
| SU8   | Epoxy-based negative photoresist.                                                    |
| SW450 | Colorectal Cancer cells                                                              |
| T47C  | Tumor Breast cells                                                                   |
| VERO  | Verda Reno Cells (Kidney Epithelial Cells<br>Extracted from an African Green Monkey) |
| WHO   | World Health Organization                                                            |
| XPS   | X-ray Photoelectron Spectroscopy                                                     |

## SUMÁRIO

|                                                                                                                                       |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Capítulo 1- Introdução, Objetivos e Organização da tese .....                                                                         | 29 |
| 1.1 Introdução e Justificativa .....                                                                                                  | 29 |
| 1.2 Objetivo.....                                                                                                                     | 33 |
| 1.2.1 Metas de Pesquisa .....                                                                                                         | 33 |
| 1.3 Organização da tese.....                                                                                                          | 35 |
| Capítulo 2- Revisão Bibliográfica.....                                                                                                | 37 |
| 2.1 Câncer no Brasil e no Mundo.....                                                                                                  | 37 |
| 2.2 Panorama da Industria Farmacêutica .....                                                                                          | 39 |
| 2.3 Cultivo de células em conformação 2D e 3D.....                                                                                    | 40 |
| 2.3.1 Agregação celular por gota .....                                                                                                | 41 |
| 2.3.2 Agregação celular por meio de superfícies não aderentes .....                                                                   | 42 |
| 2.3.3 Matrizes & Scaffolds .....                                                                                                      | 42 |
| 2.4 Sistemas Microfluídicos.....                                                                                                      | 44 |
| 2.5 Métodos de construção de dispositivos microfluídicos.....                                                                         | 45 |
| 2.5.1 Moldagem de Replica e Fotolitografia macia .....                                                                                | 46 |
| 2.5.2 Ablação á laser de CO <sub>2</sub> .....                                                                                        | 48 |
| 2.5.3 Impressão 3D .....                                                                                                              | 50 |
| 2.6 Sistemas microfluídicos para estudo de células animais.....                                                                       | 52 |
| 2.7 Gradientes de concentração para o estudo celular.....                                                                             | 53 |
| 2.8 Dispositivos microfluídicos para avaliação do<br>comportamento celular na presença de fármacos ( <i>drug<br/>screening</i> )..... | 58 |
| 2.9 Organ on a Chip (OoaC) .....                                                                                                      | 65 |
| 2.10 Conclusão.....                                                                                                                   | 69 |
| Capítulo 3 -Material e Métodos .....                                                                                                  | 70 |
| 3.1 Material .....                                                                                                                    | 70 |

|                                                                                                                                |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 3.2 Métodos.....                                                                                                               | 71  |
| Capítulo 4- Microdispositivo reversível e modular para <i>screening</i> de fármacos .....                                      | 95  |
| 4.1 Introdução .....                                                                                                           | 96  |
| 4.2 Resultados e Discussão .....                                                                                               | 99  |
| 4.4 Conclusão.....                                                                                                             | 125 |
| Capítulo 5- Sistema <i>On a chip</i> para avaliar simultaneamente a dose responsiva de dois quimioterápicos em cultivo 3D..... | 127 |
| 5.1 Introdução .....                                                                                                           | 128 |
| 5.2 Resultados e Discussão .....                                                                                               | 130 |
| 5.3 Conclusão.....                                                                                                             | 150 |
| Capítulo 6- Avaliação <i>On a chip</i> do efeito combinado e individual de fármacos em esferoides de câncer de mama .....      | 152 |
| 6.1 Introdução .....                                                                                                           | 153 |
| 6.2 Resultados e Discussão .....                                                                                               | 154 |
| 6.3 Conclusão.....                                                                                                             | 176 |
| Capítulo 7-Conclusões Finais e Perspectivas Futuras.....                                                                       | 177 |
| 7.1 Conclusões Finais.....                                                                                                     | 177 |
| 7.2 Perspectivas Futuras.....                                                                                                  | 179 |
| Capítulo 8- Referências Bibliográficas .....                                                                                   | 181 |
| Anexo I-Protocolos .....                                                                                                       | 203 |
| Anexo II- Material Suplementar Capítulo 4.....                                                                                 | 209 |
| Anexo III-Material Suplementar Capítulo 5 .....                                                                                | 219 |
| Anexo IV- Material Suplementar Capítulo 6 .....                                                                                | 224 |
| Anexo V- Licenças e Copyrights .....                                                                                           | 226 |

---

## Capítulo 1- Introdução, Objetivos e Organização da tese

---

### 1.1 Introdução e Justificativa

O câncer é um dos maiores problemas globais em termos de saúde pública. A estimativa para 2025 é um aumento de 20 milhões de novos casos de tumores no mundo, causando um enorme impacto na sociedade. Isso leva diversas empresas farmacêuticas buscar novos medicamentos que possam impactar positivamente e melhorar a qualidade de vida dos pacientes (FERLAY et al., 2019).

O processo de desenvolvimento de um novo medicamento tem um custo mundial estimado em 2,5 bilhões de dólares anuais (KINCH; MERKEL, 2015). Além disso, a maioria dos medicamentos ditos como “promissores” falham nos primeiros estágios dos testes pré-clínicos. Desta forma, é importante o desenvolvimento de novas estratégias que possam ser utilizadas para acelerar a escolha de um medicamento, diminuindo os custos envolvidos na produção do fármaco e eliminando assim, candidatos a fármacos não “promissores” na fase inicial de testes (ZHANG; RADISIC, 2017).

Mesmo os medicamentos que tiveram a sua entrada no mercado podem falhar, resultando em perdas catastróficas. As principais causas de retiradas de medicamento do mercado são a toxicidade em órgãos como coração e fígado. Outros medicamentos falham devido à falta de eficácia ou por haver pouco conhecimento do mecanismo de ação. Medicamentos como Tegaserode, Sibutramina, Propoxifeno, Vioxx e Rosiglitazona foram retirados do mercado devido a graves toxicidade cardiovascular. Em casos mais críticos como do Vioxx, um medicamento desenvolvido pela Merck, para sintomas agudos ou graves da osteoartrite, mesmo após os testes clínicos e a aprovação; foram associados a ele mais de 27.000 mortes entre 1999 e 2003. Esse fator resultou em mais de US \$ 5 bilhões em ações criminais e civis, além de prejuízos com a retirada do produto do mercado e prejuízo com a imagem da empresa (ZHANG; RADISIC, 2017).

De um modo geral, a maioria dos testes são realizados *in vitro* (placas) primeiramente, e após *in vivo* (animais e grupo de controle). Os testes *in vitro*, são geralmente realizados com as células na conformação bidimensional (células 2D). Nesse caso, as células crescem apenas nos eixos x e y, formando uma monocamada de células. O estudo na conformação 2D, possibilita obter respostas a nível de processos bioquímicos das células, auxiliando na compressão da progressão da doença (LANGHANS, 2018). No entanto, devido a essa conformação não mimetizar o que ocorre em organismo humano, em muitos casos os ensaios pré-clínicos não apresentam resultados consistentes com os obtidos em animais ou até mesmo em humanos (DUVAL et al., 2017).

Nesse contexto, as culturas tridimensionais (3D), surgem como uma alternativa para tentar mimetizar o ambiente fisiológico encontrado *in vivo*. As culturas de células 3D apresentam conformações diferenciadas, pois as mesmas estão rodeadas por uma matriz extracelular, que permite que ocorra a comunicação célula-célula. Desta forma, cria-se um microambiente que permite compreender de forma mais verossímil os processos de diferenciação e resposta celular ((MULHOLLAND et al., 2018; NUNES et al., 2019). No entanto, testes de citotoxicidade ainda são realizados em cultivo 2D, pois ainda há poucos estudos para esses ensaios em cultivos 3D.

Estudos realizados por Chitcholtan Sykes & Evans (2012) com diferentes linhagens celulares de câncer endometrial (Ishikawa, RL95-2, KLE e EN-1078D) mostraram que as taxas de proliferação celular em culturas 2D e 3D são geralmente diferentes. Além disso, elas sofrem interferência do tipo de linhagem e da presença de matriz extracelular. Os autores notaram que as células cultivadas na conformação 3D tiveram uma proliferação reduzidas em comparação com as células cultivadas em conformação 2D. Nas células 3D, a proliferação reduzida deve-se pela diminuição da expressão de um antígeno responsável pela proliferação celular (PCNA), reduzindo o número total de células em 8 dias (CHITCHOLTAN; SYKES; EVANS, 2012).

Apesar das técnicas convencionais de cultivos melhorarem a compreensão dos fenômenos bioquímicos e fisiológicos, ainda há uma deficiência em compreender o comportamento celular em condições dinâmicas e em tempo real. Assim, a microfluídica emerge como uma plataforma promissora, auxiliando nos estudos de sistemas complexos (ZHANG et al., 2018).

A microfluídica é a ciência que estuda o escoamento de pequenas quantidades de fluídos em canais com dimensões micrométricas e tem como propósito remodelar procedimentos convencionais, por meio de sistemas que apresentem formas mais compactas e versáteis (WHITESIDES, 2006). Os dispositivos microfluídicos podem ser projetados com diferentes geometrias e construídos com diversos materiais e, por isso, uma vasta gama de plataformas microfluídicas tem sido construída e aplicada nas mais diferentes áreas como: engenharia química, farmacêutica, medicina moderna e biotecnologia (ZHAO; GE; YANG, 2017; KIM et al., 2018)

Na biomedicina, o uso da microfluídica pode contribuir para o desenvolvimento de novas técnicas e formas de conduzir experimentos laboratoriais. A microfluídica apresenta inúmeros benefícios em comparação com os seus homólogos presentes na macroescala, como: menor utilização de reagentes de alto custo, ambientes biomiméticos e a capacidade de manipular células patogênicas com o mínimo contato, facilita a automação, reduz possíveis riscos de contaminações pelo operador (LEE; KHADEMHOSEINI, 2009; SZETO et al., 2015). Além disso, os métodos convencionais demandam um tempo mais elevado em termos operacionais, além de consumir uma quantidade maior de reagentes e amostras (TANYERI; TAY, 2018).

Assim, o desenvolvimento de processos microfluídicos tornam-se importante, pois permite a obtenção de resultados confiáveis e uma visão mais ampla e dinâmica dos processos bioquímicos. Isso inclui estudos de cinética celular, monitoramento das reações intracelulares, técnicas de manipulações genéticas e monitoramento do crescimento celular (ATENCIA; BEEBE, 2005; PARK et al., 2009).

Os dispositivos microfluídicos ainda podem servir como uma janela de observação para *screening* de fármacos e assim, facilitar a escolha de uma concentração de fármaco eficaz. Além disso, é possível acoplar simultaneamente aos microdispositivos sistemas geradores de gradiente de concentração. Os gradientes de concentração podem ser classificados em difusivos; que ocorre pelas interações moleculares entre duas ou mais moléculas e sem perturbações externas no meio, ou ainda gradiente de concentração convectivo, que ocorre por meio do escoamento de correntes do fluído dentro de um volume de controle (OLIVEIRA et al., 2016a; VIT et al., 2018; SOARES et al., 2019). O uso desses gradientes permite trabalhar com dispositivos para *screening* de fármacos, em

diferentes condições simultaneamente. (ZHAO; GE; YANG, 2017; TANYERI; TAY, 2018).

Estudos para *screening* de fármacos com gradiente de concentração têm sido direcionados para pesquisas envolvendo perfil de crescimento celular, processos de sinalização e resposta celular e ensaios de citotoxicidade (CHEN et al., 2015), e mesmo avaliação sinérgica do efeito de dois quimioterápicos no comportamento celular (FLONT; JASTRZĘBSKA; BRZÓZKA, 2020). No entanto, ainda não há no mercado de tecnologias microfluídicas nacionais que permitam explorar o comportamento celular em condições dinâmicas. Os poucos dispositivos presentes no mercado atualmente, são importados o que acarreta em um custo final elevado.

Além disso, muitas das publicações nesta área encontram-se basicamente em revistas de engenharia ou de áreas interdisciplinares. Isto indica que a área de microfluídica requer ainda desenvolvimento para que novas plataformas estejam prontas para que biólogos, médicos e biotecnologistas possam explorar todas as possibilidades (OLIVEIRA et al., 2016b).

Em termos de mercado mundial, vale ressaltar que a estimativa de crescimento de mercado na área de microfluídica é de 18% ao ano, com previsão para 2025 de aproximadamente 40 bilhões. Além disso, no Brasil e na América latina atualmente, não existem empresas de base tecnológica para atender a essa demanda (OLIVEIRA et al., 2016b; ZHANG; RADISIC, 2017).

Neste contexto, a presente tese teve como objetivo o desenvolvimento de um novo microdispositivo, com selagem reversível e reutilizável para o estudo do comportamento celular na presença de diferentes concentrações de fármacos. Trata-se de uma tecnologia inovadora e totalmente nacional, de rápida fabricação e altamente reprodutível. O microdispositivo tem potencial para contribuir de forma substancial nos processos de desenvolvimento de novos fármacos e/ou princípios ativos e no estudo de diferentes enfermidades. Atuando de forma dinâmica e em tempo real, podendo futuramente ser comercializado para ser utilizado por indústrias como uma etapa no processo aumento a confiabilidade dos dados gerados.

## 1.2 Objetivo

A presente tese teve como objetivo a construção de um novo microdispositivo modular e de selagem reversível, capaz de monitorar e avaliar o comportamento celular em diferentes concentrações de fármacos ao longo do tempo. Para isso, foi construído um microdispositivo em polidimetilsiloxano laminado (PDMS<sub>LAM</sub>) com 4 módulos. Após a construção, foi explorado o uso do gradiente de concentração difusivo, observando os efeitos dos fármacos nas células de forma individual e de forma combinada. Como prova de conceito, foram utilizadas células de câncer de mama (Michigan Cancer Foundation-MFC-7) e medicamentos: hidrocloreto de doxorrubicina (DOX) das famílias das antraciclinas e o fármaco paclitaxel (PXT) um taxol. Nesse intuito, para atingir o objetivo proposto e validar o microdispositivo para futuras aplicações de triagem, foram estipuladas as seguintes metas de pesquisa descritas a seguir:

### 1.2.1 Metas de Pesquisa

#### **Concepção e construção do microdispositivo:**

Análise do material utilizado para a fabricação do microdispositivo: Analisar o material utilizado para a construção do microdispositivo (PDMS laminado) em termos físico-químico. Para isso, foram realizados ensaios avaliando a resistência do material (temperatura e pressão) e ângulo de contato (molhabilidade). Além disso, foi avaliada a composição química na superfície do material (XPS). Como prova de conceito, os resultados obtidos foram comparados com o PDMS convencional.

Projeto e construção do microdispositivo: Projetar e construir microdispositivo baseado em gradiente de concentração difusivo, que permita o cultivo de células. Neste caso, foi realizado o cultivo das células na conformação 3D, utilizando uma matriz extracelular (Matrigel®). As células foram estudadas na forma livre e na forma de esferoides. Em ambos os casos as células foram envoltas por uma matriz extracelular, que permite a criação de um gradiente de concentração difusivo. Assim, foi possível observar o comportamento celular ao longo do tempo.

Verificação do funcionamento operacional: O microdispositivo foi em termo de funcionamento operacional: teste hidrostático e capacidade de geração do gradiente de

concentração difusivo em uma matriz extracelular (sem a presença de células), utilizando marcadores com fluorescência.

### **Estudo do comportamento celular**

Verificação do microdispositivo em termos celular: Analisar os cultivos nas conformações 3D (células livres e esferoides) no microdispositivo, com e sem a presença de gradiente de concentração. As células foram primeiramente cultivadas em garrafas e após atingirem 80% da confluência (crescimento atingindo 80% do espaço da garrafa de cultura), foram retiradas e inoculadas no microdispositivo, juntamente com uma matriz extracelular. No caso dos esferoides, eles foram cultivados primeiramente em frascos próprios para cultivos 3D (técnica de agregação por superfície não-aderente). Após o cultivo em placas, os esferoides foram retirados e, então adicionados no microdispositivo juntamente com uma matriz extracelular (Matrigel®) e agarose. Os esferoides foram avaliados em termos da morfologia e em termos de viabilidade celular. O comportamento dos esferoides em cultivo microfluídico foi comparado com técnicas convencionais (frascos de cultura).

Avaliação do comportamento na presença de fármacos: As células de câncer de mama (isolada e esferoides) foram avaliadas na presença de um gradiente de fármacos. Para isso, foram utilizados dois fármacos modelos: paclitaxel (PXT) e doxorubicina (DOX), onde foi observado o efeito isolado e combinado dos fármacos na viabilidade celular em cada concentração testada por 180 min. No caso dos esferoides, os testes com fármacos foram realizados sem a geração de um gradiente de concentração.

### **Análise de imagens**

Análise de imagens: Para avaliar a viabilidade celular em cada uma das concentrações de fármacos e em cada tempo, foi desenvolvida uma rotina em MATLAB, que avalia as células viáveis e não viáveis em cada uma das concentrações testadas. O algoritmo criado primeiramente divide as imagens obtidas em quadrantes virtuais, e para cada quadrante foram analisadas as células viáveis por meio intensidade que a membrana celular emite (para células sem marcação) ou pela intensidade de pixel emitida pelos marcadores de viabilidade (coloração verde corresponde as células viáveis e a coloração vermelha a células não-viáveis). Assim, estipulando uma faixa de intensidade média de pixel, o

algoritmo discrimina as células viáveis das não viáveis. Para os esferoides, a análise da viabilidade foi realizada pela área dos esferoides, contabilizando apenas os pixels em verde (células viáveis). Essa análise foi realizada em colaboração com o Laboratório de Materiais e Dispositivos Fotônico, coordenado pelo Professor Eric Fujiwara, com o auxílio da aluna de doutorado da Faculdade de Engenharia Mecânica Yu Tzu Wu.

### **Análise estatística**

Análise estatística: Para avaliar os resultados obtidos estatisticamente, foi realizado ANOVA de uma via e Teste de Tukey. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas e em 3 ensaios isolados (ensaios em dias diferentes), verificando também a reprodutibilidade dos resultados.

### **1.3 Organização da tese**

A tese foi organizada na forma de capítulos seguindo o seguinte formato:

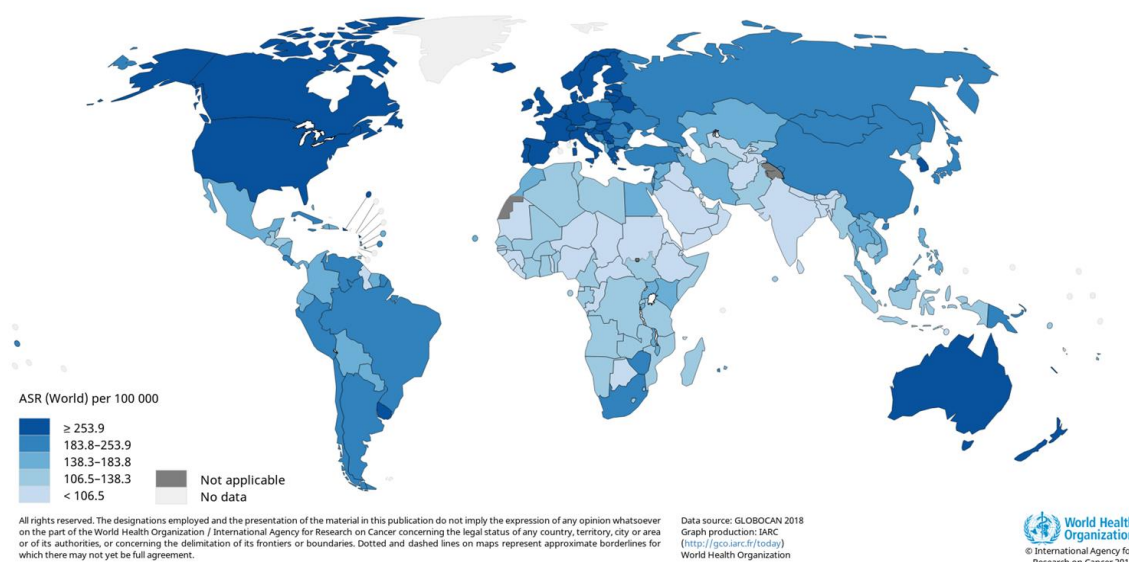
- Capítulo 1: Introdução e objetivos: Nesse tópico foi realizada uma breve contextualização do tema, abordando a importância da utilização dos microdispositivos para estudo do comportamento celular, juntamente com a justificativa e a relevância do trabalho. Para a execução do projeto, foi estabelecido um objetivo principal seguido de cinco objetivos específicos.
- Capítulo 2- Revisão da Literatura: Nesse Capítulo, foi realizado um levantamento da literatura, com trabalhos relevantes que auxiliem o leitor na compreensão sobre os temas abordados na tese. Devido à complexidade do tema e se tratando de um projeto multidisciplinar, foram abordados diversos trabalhos que exemplificam desde do panorama do câncer no mundo até trabalhos mais relevantes no estudo de *drug screening*.
- Capítulo 3-Metodologia: Neste capítulo é apresentada a descrição detalhada das metodologias utilizadas na tese nos capítulos 4, 5 e 6. A metodologia está organizada na forma que explique a análise do material, a construção do microdispositivo, o cultivo de células os ensaios com os fármacos, análise estatística e finalmente a análise de imagens.

- Capítulo 4 Microdispositivo reversível e modular para *screening* de fármacos: O Capítulo 3, compreende na apresentação dos resultados relativo a concepção e desenvolvimento do microdispositivo, onde foram realizadas análises físico-químicas do material (PDMS<sub>LAM</sub>), comparando o resultado com o seu análogo (PDMS convencional), análises operacionais (vazão), análise biológica (cultivo celular (2D-células isoladas), crescimento celular e viabilidade), a geração de gradiente de concentração e finalmente a prova de conceito do microdispositivo, utilizando o gradiente de concentração com fármaco doxorrubina (DOX).
- Capítulo 5- Sistema *On a chip* para avaliar simultaneamente a dose responsiva de dois quimioterápicos em cultivo 3D: No Capítulo 5, foram realizadas uma serie de validações e melhoramentos no microdispositivo. As células foram estudadas isoladamente, em uma matriz extracelular (Matrigel®) e agarose. Foi verificada a eficácia do gradiente de concentração difusivo, avaliando o efeito predominante do fármaco na morte celular e a capacidade de gerar um gradiente duplo de concentração utilizando dois fármacos (DOX e PXT) de forma simultânea.
- Capítulo 6- Avaliação *On a chip* do efeito combinado e individual de fármacos em esferoides de câncer de mama: No Capítulo 6, foi observado o comportamento celular no microdispositivo na conformação de esferoides. Os esferoides foram avaliados morfolologicamente, onde foi avaliada também viabilidade com e sem a presença dos fármacos. Além disso, foi realizada uma modificação na geometria do microdispositivo, possibilitando analisar a reação do LDH com o regente no próprio dispositivo. Esse novo dispositivo foi novamente validado operacionalmente para essa nova análise, sendo os resultados obtidos comparados com os resultados obtidos na coleta por auxilio de mangueiras.
- Capítulo 7-Conclusões finais e Perspectivas Futuras: Após apresentar os resultados para cada capítulo, foi realizada uma conclusão geral sobre todo o projeto e as perspectivas futuras, focando no melhoramento e ampliação das análises que podem ser realizadas no microdispositivo.
- Capítulo 8- Referências bibliográficas: Descrição da bibliográfica utilizada para compor a presente tese de doutorado.
- Anexos: Material suplementar relativo a cada Capítulo da tese

## Capítulo 2- Revisão Bibliográfica

### 2.1 Câncer no Brasil e no Mundo

O câncer é um conjunto de mais de 100 doenças, no qual as células se multiplicam de forma desordenada, invadindo os tecidos dos órgãos, e em muitos casos podendo se alastrar para diferentes partes do corpo, causando metástase (NATIONAL CANCER INSTITUTION, 2015; SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2020). É inegável que o câncer é um dos maiores problemas em termos de saúde pública, principalmente nos países em desenvolvimento. É estimado para 2025 um aumento de 20 milhões de novos casos de tumores, causando um enorme impacto na sociedade. na Figura 1, é possível ver a incidência de câncer em termos mundiais. Os dados apresentados excluem câncer de pele do tipo não-melanoma (BRAY et al., 2018; FERLAY et al., 2019).



**Figura 1:** Incidência de câncer mundial, combinando homens e mulheres. Taxa padrão por idade a cada 100 mil pessoas. Dados referentes ao ano de 2018. Fonte: Globocan-International Agency for Research of Cancer. <https://gco.iarc.fr/today/home>.

No Brasil, segundo o Instituto Nacional de Câncer José de Alencar Gomes da Silva (INCA), a taxa estimada de câncer para 2020 foi de 625 mil novos casos. Apesar do Brasil possuir um núcleo de apoio ao combate ao câncer, auxiliando na prevenção dessa enfermidade e no desenvolvimento de pesquisa nessa área (BRASIL.; MINISTÉRIO DA SAÚDE; DATASUS, 2017; INCA, 2019) ainda é notável que o câncer possui um forte impacto sobre a população, sendo imprescindível um planejamento e ações de prevenção para o controle desta doença.

Os atuais tratamentos convencionais para os mais diversos tipos de tumores, são baseados em tratamentos já pré-estabelecidos como: quimioterapia, radioterapia e cirurgias. Entre os tratamentos, a quimioterapia ainda é o método mais eficaz. Ela consiste a infusão de medicamentos que atuam diretamente nas células tumorais, por diferentes mecanismos. Dentre os fármacos mais utilizáveis destacam-se as das classes das antraciclinas (*e.g.* doxorrubicina- “químio vermelha”), um antibiótico que atua direto no DNA das células, intercalando as bases nitrogenadas e levando as células ao processo de apoptose. No caso dos fármacos da família dos taxóis, (*e.g.* paclitaxel- “químio branca”), que atua na parte estrutural das células, mais especificamente polimerizando os microtúbulos, impedindo a multiplicação celular (CARVALHO et al, 2020).

No entanto, esse tipo de tratamento acaba sendo limitado, visto que durante o processo pode ocorrer resistência por parte do organismo do paciente aos procedimentos aplicados. A origem da resistência celular pode ter múltiplos fatores como a característica inerente de uma subpopulação de células cancerosas heterogêneas ou mesmo a aplicação de uma concentração inadequada de fármacos nos pacientes (HU et al., 2019).

Em resumo, o desenvolvimento e progressão do câncer podem variar de paciente para paciente, e em alguns casos, o melhor tratamento para uma pessoa pode ser prejudicial ou ineficaz para outra pessoa. Neste contexto, uma alternativa é a triagem combinatória de fármacos. A administração simultânea de fármacos pode atuar em diferentes mecanismos moleculares, reduzindo os riscos de resistência aos medicamentos e aumentando as chances de eliminar as células tumorais (SUN et al., 2017b).

Outro fator crítico é necessidade de obter altas quantidades de células (oriundas do paciente), necessárias para estudar a progressão do tumor. A quantidade de células

tumorais presente no plasma sanguíneo varia entre uma a dez células tumorais por bilhão de células sanguíneas. Estas células servem como marcadores de metástase e devido sua baixa abundância os resultados obtidos a partir de estudos preliminares, nem sempre correspondem a situação real do paciente. Nesta situação, encontrar as células tumorais para uma análise mais eficaz, torna-se um grande desafio técnico e científico (KOWALIK; KOWALEWSKA; GÓŹDŹ, 2017).

Sendo assim, pesquisas para desenvolver técnicas individualizadas e que utilizem pequenas quantidades de células, para estudar os diferentes mecanismos apresentados pelas células tumorais, assim como a sua inibição são necessárias. Uma das estratégias é a investigação inicial do comportamento celular em condições *in vitro*, onde as células dos pacientes são cultivadas de forma tradicional, e são testados diferentes tipos de fármacos a serem utilizados no tratamento.

Essas técnicas podem auxiliar na escolha eficaz de um fármaco, pois analisam o equilíbrio entre a eficácia e a toxicidade do medicamento (GERLINGER et al., 2012). Para isso são necessárias que técnicas de cultivo celulares sejam adequadas.

## **2.2 Panorama da Indústria Farmacêutica**

A indústria farmacêutica visa além da produção de medicamentos, o desenvolvimento, pesquisa, comercialização e distribuição de medicamentos. O processo de comercialização de medicamentos, ocorre apenas após uma série de testes, o que leva meses ou até mesmo anos para que um medicamento esteja apto a ser comercializado. Esse processo além de ser exaustivo também é caro, sendo geralmente embutido no valor do medicamento (WU et al., 2019).

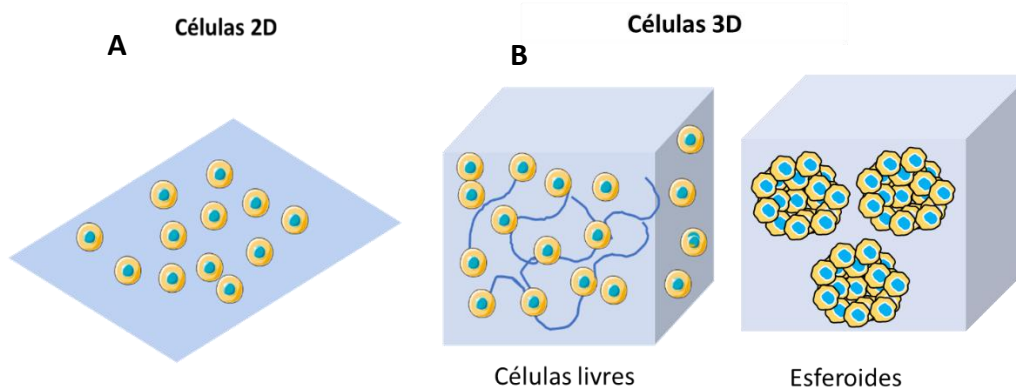
No Brasil, o desenvolvimento da indústria farmacêutica está atrelado praticamente à saúde pública e às práticas sanitárias de prevenção a doenças infectocontagiosas. Dentre os principais produtos desenvolvidos pelas indústrias farmacêuticas brasileiras, destacam-se: produção de soros e a produção de vacinas (BLUNDELL, 2012; DUARTE et al., 2015).

Por isso, diferentes técnicas de cultivo são empregadas para garantir maior confiabilidade nos testes e diminuir o tempo de comercialização de um novo medicamento.

### 2.3 Cultivo de células em conformação 2D e 3D

O estudo de cultura de células animais é imprescindível para compreender os processos metabólicos, selecionar fármacos e minimizar os estudos em animais (GERAGHTY et al., 2014). O cultivo 2D é o mais comumente utilizado na área biológica, e recebe esta denominação pois as células apenas crescem nos eixos x e y (Figura 2A). O procedimento é relativamente simples e as células são cultivadas normalmente em frascos ou em placas de Petri, em meio de cultivo apropriado. Neste tipo de cultivo, as células estão dispostas na forma de uma monocamada (KAPAŁCZYŃSKA et al., 2016).

Apesar do cultivo 2D permitir a obtenção respostas satisfatórias sobre os processos bioquímicos celulares, esta estratégia é limitada quando se trata em mimetizar as interações células-células que ocorrem em condições fisiológicas *in vivo*. Desta forma, as investigações *in vitro* geram, em muitos casos, diferentes repostas das obtidas em ensaios *in vivo*. No entanto, culturas 2D são alternativas viáveis para estudos *single cell* e análises comparativas de sistemas menos complexos. Como alternativa para estudos que envolvem uma complexidade mais avançada, como co-culturas, o cultivo 3D tem se mostrado promissor na área biológica (PAGE; FLOOD; REYNAUD, 2013). Neste caso, as células são rodeadas por uma matriz extracelular, que facilita a comunicação e secreção celular (Figura 2B), sendo muito semelhante com que ocorre *in vivo*, visto que as células permanecem 100% expostas a vizinhança (COSTA et al., 2016).



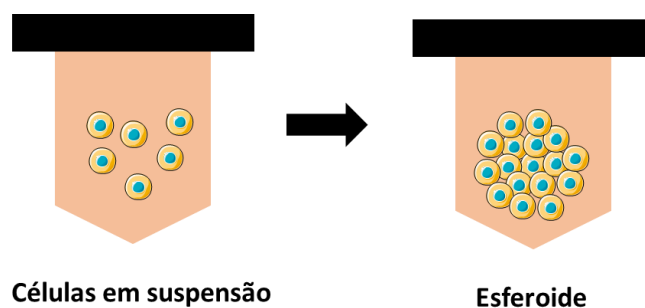
**Figura 2:**Diferenças entre as culturas de células 2D e 3D. (A) células cultivadas em cultura 2D adotam uma morfologia planar cobrindo principalmente o plano x-y e tem uma altura reduzida no plano z. (B) no caso de cultivo 3D, as células estão envoltas em uma matriz extracelular, em alguns casos, a morfologia pode ainda adotar uma forma mais esférica (esferoides), crescendo de forma uniforme nos planos x-y e z. FONTE: ADAPTADO DE GUPTA et al (2016)

Existem diferentes métodos de cultivo de células 3D reportado na literatura. Uma estratégia de cultivo em conformação 3D é a partir da formação dos chamados esferoides. Os esferoides são modelos tridimensionais, no qual as células agregam-se uma as outras. Muitas células de mamífero tem a capacidade de se agregar e diferenciar nessas estruturas tridimensionais, quando cultivadas em suspensão e em um ambiente não aderente (GUPTA et al., 2016). Os esferoides podem ser formados a partir de diferentes técnicas, destacando entre elas: auto agregação por gota, agregação em superfície não aderente e matrizes *scaffolds*.

### 2.3.1 Agregação celular por gota

Este é um método relativamente simples e fácil de executar e com uma reprodutibilidade de 100% para produção de esferoides das mais diferentes linhagens celulares. O protocolo consiste em adicionar um pequeno volume (20-50  $\mu\text{L}$ ), contendo uma concentração de 50-500 células/mL em poços com alguma matriz extracelular (Figura 3). Geralmente, são utilizados poços com o fundo arredondado para facilitar a formação das gotas. Após a semeadura das células nos poços, a placa é invertida, formando uma gota (SHRI et al., 2017; RYU; LEE; PARK, 2019).

Por sua vez, as células se concentram nas superfícies da gota e permanecem no lugar devido à tensão superficial. Dessa forma, são formados esferoides homogêneos. Uma desvantagem desse método é que, para volumes superiores de 50  $\mu\text{L}$ , essa técnica não pode ser utilizada uma vez que a tensão superficial não é suficiente para segurar a gota.

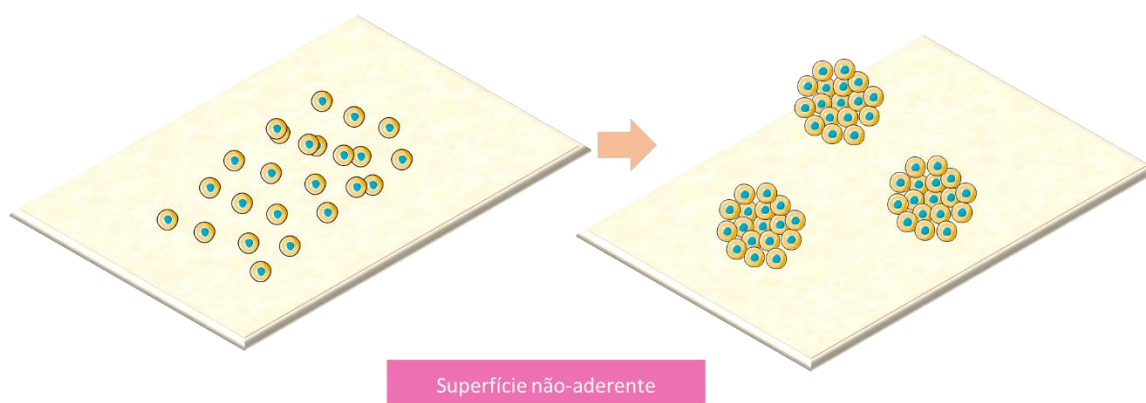


**Figura 3:** Esquema de formação de esferoide por agregação por gota. FONTE: ADAPTADO DE RYU, LEE, PARK (2019)

### 2.3.2 Agregação celular por meio de superfícies não aderentes

Nesse procedimento são realizadas modificações na superfície da placa de cultivo que impedem que as células fiquem aderidas à superfície, e assim promove a interação célula-célula.

Tsai e colaboradores (2021) criaram um método simples para a formação e preservação de esferoides de células-tronco. Os autores construíram um filme fino poroso de poli (D, L-ácido láctico-nanofolha porosa) fabricado por um método de revestimento de rotogravura *roll-to-roll* combinando um processo de gravação com solvente. A nanofolha porosa obtida tinha menos de 200 nm de espessura e uma área de poro média de  $6,6 \mu\text{m}^2$  com uma porosidade de 0,8876,6 (Figura 4). A nanofolha, ofereceu uma superfície não aderente para as células-tronco formarem esferoides estáveis, com tamanho médios de 100  $\mu\text{m}$ , formados em 5 dias (TSAI et al., 2021).

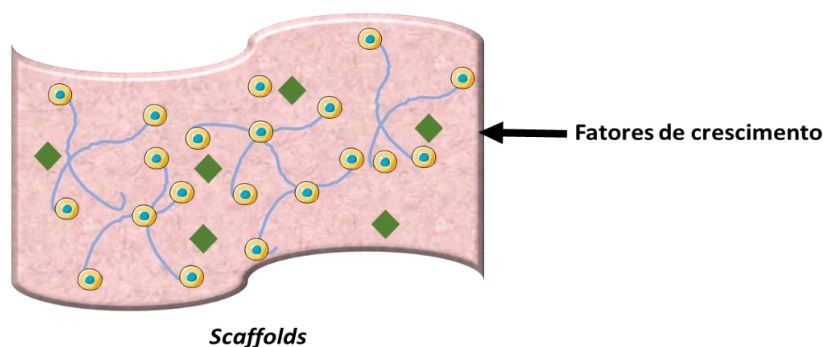


**Figura 4:** Método de agregação forçada para a formação de esferoides, onde ocorre uma modificação química ou física na superfície da placa, para evitar a adesão das células. FONTE: ADAPTADO DE TSAI ET AL (2021).

### 2.3.3 Matrices & Scaffolds

Para a cultura 3D baseada em *scaffolds*, a formação de esferoides consiste em formar uma rede de fibra de hidrogéis como: colágeno, laminina, alginato, que permitem que as células fiquem mais próximas umas das outras, facilitando a comunicação entre elas. À medida que as células se dividem e crescem, elas preenchem o espaço intersticial entre as fibras, produzindo assim, uma morfologia 3D. Tipicamente, esses hidrogéis são conhecidos por oferecerem uma estrutura porosa que permite a disponibilidade prolongada de nutrientes e oxigênio, que são necessários para a sobrevivência das células.

Além disso, essas matrizes também são responsáveis por remover os subprodutos gerados pelas células (Figura 5). Esta montagem proporciona condições adequadas de cultura celular, melhorando a mobilidade e organização das células (EDMONDSON et al., 2014).



**Figura 5 :** Sistema *scaffolds* para a formação de esferoides. Consiste em uma rede de fibras de hidrogéis como colágeno, laminina, alginato, que permite que as células fiquem mais próximas umas das outras. Dessa forma, proporciona uma maior interação e a formação de esferoides. FONTE: ADAPTADO DE EDMONDSON et al (2014).

Além de melhorar a comunicação entre as células, o cultivo 3D apresenta uma série de vantagens quando comparado ao cultivo 2D. Uma das desvantagens é a morfologia das células; as cultivadas em 2D tendem a formar uma monocamada, que geralmente não sofre alterações quando expostas a situações de estresse. Este comportamento foi observado em um estudo comparativo nos anos 90, utilizando células de carcinoma de bexiga (HTB-3) e células de bexiga não modificadas. Nesse estudo, Boxberger e Meyer (1994), observaram que, em culturas 2D, as células não apresentaram alteração na morfologia entre as células não modificadas geneticamente e as células modificadas (células de carcinoma). No entanto, nas culturas 3D foram claramente observadas alterações morfológicas, no alinhamento, na integridade e polarização das células, bastante similar ao que ocorre em processos fisiológicos (BOXBERGER; MEYER, 1994).

Outra diferença entre as culturas 2D e 3D, refere-se à diferenciação celular. Nas células 3D a diferenciação é bem evidenciada, o que não ocorre em cultura 2D. Segundo Farrell, Byrne & Fischer e colaboradores (2007), que realizaram um estudo de modulação da osteogênese em ratos adultos, foi possível identificar, que em culturas 3D a expressão de colágeno tipo I em células mesenquimais (células do cordão umbilical), enquanto em culturas 2D, não era possível identificar esse tipo de expressão. Os testes de viabilidade

celular também mostraram que as células em cultura 2D eram menos viáveis e mais suscetíveis à apoptose do que as células em cultura 3D ao longo do tempo (FARRELL et al., 2007). Além disso, as células em cultura 3D se comportam de forma diferente devido às interações célula-célula serem mais proeminente (WANG; TONG; YANG, 2014).

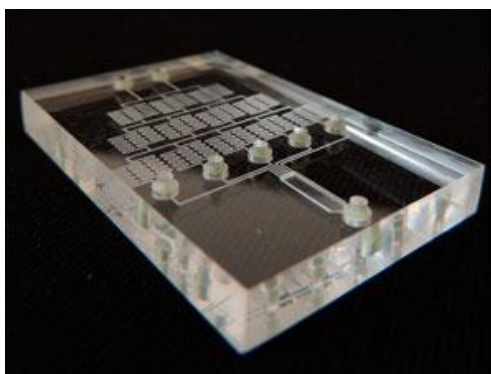
Apesar dos esforços em criar microambientes similares aos ambientes *in vivo*, estudos relacionados à complexidade multicelular ainda podem ser melhorados com o emprego de condições de cultivo dinâmico. Neste caso, a microfluídica emerge como uma tecnologia de alto potencial científico (VAN DUINEN et al., 2015).

## 2.4 Sistemas Microfluídicos

Microfluídica é uma área multidisciplinar que atua na construção de dispositivos em escala micrométrica e opera utilizando pequenas quantidades de fluidos (FIGURA 6). As características hidrodinâmicas impostas nestes sistemas permitem o controle no espaço e no tempo, diminui a quantidade de reagentes amostras e, minimiza os efeitos de transferência de calor e de massa (CONVERY; GADEGAARD, 2019). Os fluidos confinados escoam em canais com dimensões micrométricas (GOU et al., 2018) em regime predominantemente laminar (PERRODIN; SELLA; THOUIN, 2020)

Devido a essas características, a microfluídica amplia as possibilidades de estudos celulares em condições dinâmicas permitindo, por exemplo, investigar mecanismos de resposta celular, sinalização e ensaios de citotoxicidade, pois é capaz de mimetizar microambientes celulares (CIMETTA et al., 2013).

As propriedades singulares apresentadas pelos sistemas microfluídicos podem mudar a forma de investigar e indicar uma nova visão para a ciência mediante as possibilidades de construção de novas ferramentas/dispositivos que contribuam principalmente nas áreas médica, química e biológica (WOOTTON; DEMELLO, 2012; ZHAO; GE; YANG, 2017; KIM et al., 2018)



**Figura 6:** Exemplo de dispositivo microfluídico. FONTE: AGENCY FOR SCIENCE TECHNOLOGY AND RESEARCH SINGAPORE (2017).

Estudos no início dos anos 2000 envolvendo simulações numéricas de fluxo, como apresentado por Lutz; Cheng e Schwartz (2003) já apontavam que dispositivos micrométricos projetados para realizar tarefas específicas possuíam superioridade sobre seus análogos em macroescala, e em muitos casos, possibilitam aplicações que não seriam viáveis nessa magnitude (LUTZ; CHEN; SCHWARTZ, 2003).

Alguns tipos de dispositivos microfluídicos permitem observar a cinética das reações em tempo real e de forma eficaz, além de quantificar essas reações por meio de sensores específicos (SONG et al, 2020). Esses dispositivos também permitem o estudo de técnica de cultivo de células animais (KIMURA; SAKAI; FUJII, 2018), sínteses de células artificiais (SATO; TAKINOUE, 2019), técnica de seleção celular (SHIELDS; REYES; LÓPEZ, 2015).

Sendo assim, a microfluídica pode auxiliar, promovendo estudos aprimorado utilizando células animais. Os microdispositivos microfluídicos, possibilitam obter respostas bioquímicas celulares, ao mesmo tempo em que permite testar diferentes a concentrações de fármacos e/ou reagentes, em apenas um único ensaio. Os métodos de fabricação e as características abordadas, são responsáveis por destacar a microfluídica como uma plataforma tecnológica promissora no estudo de células animais.

## **2.5 Métodos de construção de dispositivos microfluídicos**

Por ser uma plataforma promissora, a microfluídica busca sempre explorar novos materiais e técnicas para a fabricação de microdispositivos. Neste contexto, devem ser consideradas técnicas de fabricação rápidas, que utilizem polímeros biocompatíveis (no

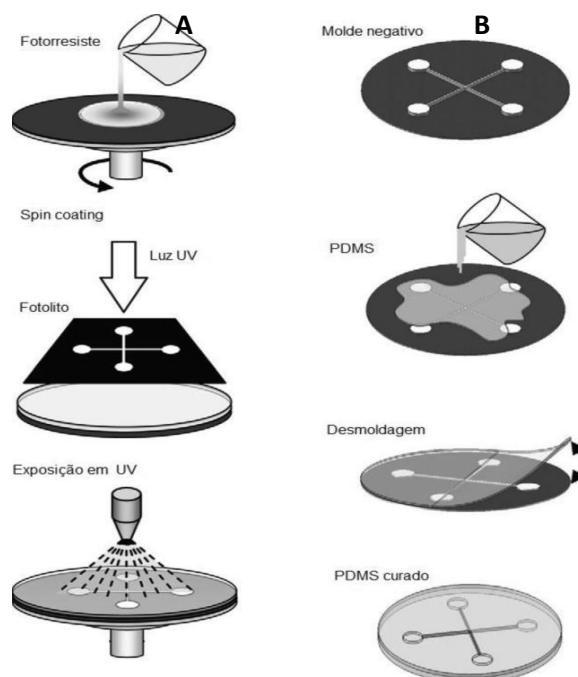
caso de sistemas biológicos) e que permitam reprodutibilidade do processo. No caso de microdispositivos para ensaios biológicos, a técnica ainda mais utilizada é a fotolitografia macia, por ser uma técnica bastante estabelecida e confiável, além de possibilitar a construção de diferentes geometrias (CARDOSO; SILVERIO, 2021).

### *2.5.1 Moldagem de Replica e Fotolitografia macia*

A fabricação de dispositivos microfluídicos em polidimetilsiloxano, (PDMS) utilizando fotolitografia macia e /ou moldagem de replica remonta-se à década de 70, com os primeiros trabalhos de nano-estampagem para replicação em nanoestruturas (ROGERS; NUZZO, 2005). No entanto, grande popularidade do PDMS surge a partir dos trabalhos de George M. Whitesides e seu grupo de microfluídica na Universidade de Harvard (LI et al., 2014).

O grupo adotou o PDMS, após de Chaudhury (cientista da companhia Dow Corning responsável por comercializar este produto com o nome de Sylgard 184), apresentar o polímero para os pesquisadores. A formação do material, dá-se a partir da polimerização utilizando um agente reticulante (agente de cura). A grande vantagem deste material é que a cura pode ocorrer a temperatura ambiente sem produzir subprodutos de reação ou liberação de solventes, o que possibilita a moldagem em cavidades fechadas, com diferentes graus de confinamento.

A Figura 7, ilustra uma sequência de fabricação de um microdispositivo microfluídico, utilizando PDMS como material. A fabricação é realizada em duas etapas: (A) construção do molde e (B) replicação do moldado (LIN; PAN; WU, 2011).



**Figura 7:** Sequência de fabricação de um dispositivo utilizando a técnica de moldagem de replica. (A) Fabricação do molde. (B) Fabricação do dispositivo, após a construção do molde. FONTE: LIN, PAN &WU. (2011). Imagem reproduzida sob a autorização da Elsevier.

A fabricação do microdispositivo por meio de replicação de molde, começa com a criação do desenho do dispositivo, geralmente são utilizados programas vetoriais específicos para essa finalidade. Após a finalização do desenho, uma impressora de alta resolução imprime o desenho na forma de uma fotomáscara, deixando transparente apenas a geometria dos canais que será gravada no microdispositivo. (Figura 7 A).

Para criar essas geometrias, primeiramente é necessário criar um molde, sendo utilizado geralmente um substrato (bolacha) de silício ou quartzo. É sobre essa bolacha que será depositado uma fina camada de um fotorresiste espesso (geralmente o SU8), que permite a impressão da fotomáscara na bolacha de silício. Após o fotorresiste estar uniforme, o mesmo é exposto a, juntamente com a fotomáscara, para gravar os canais no molde. Após a exposição a luz UV, é utilizado um reagente revelador, que como em um processo de fotografia convencional, que revela a geometria do dispositivo desenhado. No caso da fotolitografia macia, o processo é praticamente o mesmo citado a cima, no

entanto invés de utilizar o fotorresiste como molde, é utilizado o moldado (PDMS) como molde para replicar outros microdispositivos (LIN et al., 2018b).

Esses moldes uma vez fabricados, podem ser usados por tempo indeterminado. No caso da replicação por replica de molde, pode ocorrer quebra do fotorresiste, que é responsável pela formação das geometrias. Nesse caso, será necessário refazer o molde. A replicação do moldado, é realizada depositando PDMS sob o molde como pode ser observada na Figura 7B. Para dar estabilidade ao dispositivo, é utilizado juntamente ao PDMS um agente de cura, na proporção 10:1(v/v) respectivamente. O molde juntamente com o PDMS, passa por processos térmicos, e então retirado o moldado do molde, já com a geometria gravada (LIN et al., 2018b). Apesar de ser uma técnica já bem estabelecida, é uma técnica demorada e que necessita de sala limpa.

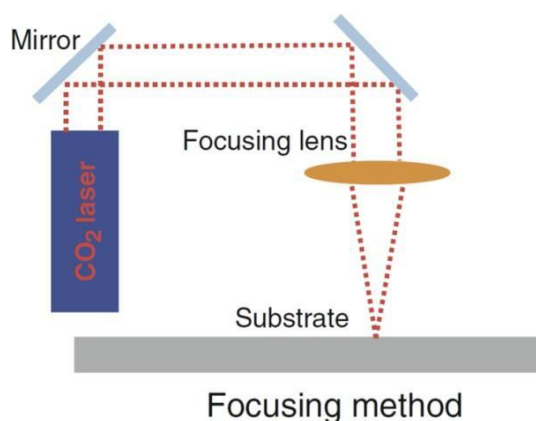
Atualmente, diferentes métodos e técnicas de moldagem têm sido apresentados na literatura para produzir geometrias variadas em PDMS. Essas técnicas podem ser combinadas com a própria fotolitografia para a fabricação de moldes, por exemplo, e utilizando outras técnicas para replicação dos dispositivos (THANGAWNG et al., 2007; LIN et al., 2018b; CARDOSO; SILVERIO, 2021)

### 2.5.2 Ablação á laser de CO<sub>2</sub>

Já faz um tempo que alguns grupos de pesquisas vêm investigando o uso de laser para criação de dispositivos microfluídicos. Uma das primeiras investigações foi realizada por Klank et al. (2002), que utilizou um sistema com laser de CO<sub>2</sub>. O sistema foi projetado originalmente para a marcação de peças em escala industrial, porém os autores conseguiram desenhar microcanais em substratos poliméricos, com profundidade de 100- 300 µm, largura de cerca de 250 µm, utilizando um laser com potência de 10-60 W e uma velocidade de varredura no intervalo 80- 400 mm/s (KLANK; KUTTER; GESCHKE, 2002)

O funcionamento da ablação a laser consiste em um dispositivo chamado soprador (um tipo de turbina) que gira a 900hz e é responsável por circular CO<sub>2</sub> (gás carbônico) dentro de uma câmara. Nessa câmara, existem dois eletrodos ligados a uma fonte de alta-tensão, que criam um campo elétrico aumentando a energia do gás (CO<sub>2</sub>) dentro da câmara. Em razão a esse acréscimo de energia, os elétrons de CO<sub>2</sub> se excitam e mudam

de nível orbital, passando a girar em níveis mais externos (Figura 8). Para que o corte seja feito, um gerador de alta potência produz um raio que é transportado para a cabeça de corte e direciona o feixe de laser para um caminho ótico, por meio de espelhos ajustáveis (YU et al., 2018)



**Figura 8:** Esquema do processo de ablação a laser CO<sub>2</sub> utilizando método de feixe de laser focado FONTE: HONG (2010). Imagem reproduzida sob a autorização da Springer Nature.

O raio, que até então apresentava baixa densidade de energia, atravessa uma lente de foco que ajusta a intensidade e o tamanho do feixe. É no cabeçote da máquina laser, que a luz é concentrada através de lentes em um único ponto. Esse direcionamento da luz a laser, ocorre em um diâmetro inferior a 0,25mm FONTE: (HONG et al., (2010)

Utilizando essa técnica, Snakenborg et al. (2003) investigou a viabilidade de imprimir pequenos microcanais em uma superfície de polimetacrilato de metila (PMMA) usando um feixe de laser de CO<sub>2</sub> e desenvolveu um modelo simples para relacionar a profundidade do canal com a velocidade e a potência do sistema a laser (SNAKENBORG; KLANK; KUTTER, 2003)

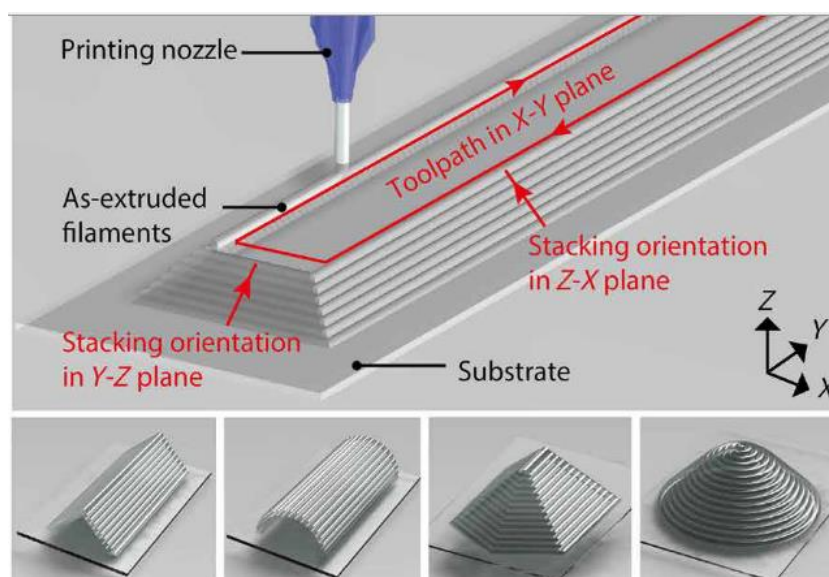
Oliveira et al (2016 b) e Vit et al (2018) utilizaram a técnica de ablação a laser de CO<sub>2</sub>, para projetar o microcanais, responsáveis por gerar um gradiente de concentração, e transportar nutrientes para as células microbianas (OLIVEIRA et al., 2016a; VIT et al., 2018)

O sistema de ablação a laser possibilita prever a profundidade e o perfil do canal recortado em função dos parâmetros de processamento da técnica, além de ser uma alternativa rápida e sem necessidade de sala limpa (MARTÍNEZ-LÓPEZ et al., 2017)

### 2.5.3 Impressão 3D

A impressão 3D foi desenvolvida nos meados dos anos 80, no entanto passou ser uma alternativa viável para a fabricação de microdispositivos, no final dos anos 2000. A impressão 3D funciona a partir da modelagem de um objeto pela deposição de um polímero fundido, onde os termoplásticos são aquecidos acima de sua temperatura de transição vítrea e extrudados através de um bico (como uma injetora) em uma condição pré-determinada.

Após cada camada ser concluída, o objeto é movido para baixo e a próxima camada é depositada no topo do mesmo objeto (Figura 9). A impressão 3D, pode ser uma alternativa viável para a construção de microdispositivos, uma vez que é um processo rápido e barato (MAEKI et al., 2018; CONVERY; GADEGAARD, 2019; SU et al., 2020).



**Figura 9:** Esquema da impressão 3D de um canal microfluídico, modelos 3D de estruturas autossustentadas, incluindo canal triangular, canal circular, cúpula hexagonal e cúpula cônica. FONTE SU et al (2020). Imagem reproduzida sob a autorização da Science Advances.

A fabricação de microdispositivos para aplicação biológica pode ser interessante, uma vez que é de fácil operação, não necessitando de sala-limpa e sistema complexo de operação. Além disso, é possível incorporar na impressão 3D, *scaffolds* com alta porosidade, alta resolução e estrutura de poros definida no próprio microdispositivo, utilizando uma variedade de materiais diferentes (HO et al., 2015).

Chen et al (2020) desenvolveram um microchip para detectar células tumorais circulatórias, utilizando a técnica de impressão 3D. Neste estudo, o microchip foi funcionalizado com anticorpos anti-EpCAM (molécula de adesão de células epiteliais) para isolar CTCs das amostras de sangue humano. O microdispositivo possui uma área de superfície grande, facilitando o escoamento dos fluidos, e consequentemente, aumentando a eficiência de captura de células tumorais (comprimento do canal =2 cm), operando numa vazão de 1 mL / h. Os autores utilizaram três linhagens de células de câncer que apresentavam EpCAM positivo (câncer de mama MCF-7, câncer de cólon SW480 e câncer de próstata PC3) e uma linhagem de célula tumoral com EpCAM negativo (câncer renal 293T). Os autores obtiveram uma eficiência de captura superior a 90%. Além disso, o sistema foi capaz de isolar as células tumorais MCF-7, das células tumorais presentes nas amostras de sangue humano. Esse sistema pode auxiliar a detectar alguns tipos de tumores precocemente, e assim iniciar o tratamento previamente, aumento as chances do paciente responder de forma positiva ao tratamento do câncer (CHEN et al., 2020a).

A impressão 3D pode ser utilizada para identificar biomarcadores de interesse. No trabalho de Samper et al (2020), foi desenvolvido um microdispositivo, construído em impressão em 3D, mecanicamente robusto para a análise on-line de alta resolução de biomarcadores apresentado por pacientes com lesões cerebrais. O microdispositivo opera utilizando fluxo de microdialisado, com vazões na faixa de microlitros por minuto. O dispositivo consiste em um canal microfluídico com conexões seguras de baixo volume que facilmente integra biossensores eletroquímicos para biomarcadores como glutamato, glicose e lactato. O dispositivo foi utilizado para registrar as alterações simultâneas nas concentrações de glutamato, glicose e lactato, simulando a resposta fisiológica aos eventos de despolarização em expansão do líquido cefalorraquidiano (SAMPER et al., 2019).

A impressão 3D, também pode ser aplicada para construção de microdispositivos capazes de identificar sinalizadores específicos de células tumorais; como exossomas. Os exossomas são vesículas lipídicas, compostas por material genético, que podem atuar como sinalizadores. A quantificação de exossomas derivados de tumores, tem um forte potencial para o diagnóstico minimamente invasivo do câncer durante seu estágio inicial. No entanto, como os exossomas cancerosos formam uma pequena fração de todos os exossomas presentes no sangue, a detecção é complicada, necessitando de um sistema ultrasensível para os diagnósticos de tumores baseados em exossomas.

Kashefi-Kheyraadi e colaboradores (2020), desenvolveram um microdispositivo com um aptasensor eletroquímico (DeMEA), utilizado para detecções altamente sensíveis. O microdispositivo foi construído em impressão 3D invólucro magnético foi integrado ao aptasensor. O microdispositivo ainda permite coletar os exossomas presentes para realização e análises. O microdispositivo se apresenta como solução eficaz para a detecção precoce de biomarcadores cancerígenos(KASHEFI-KHEYRABADI et al., 2020).

## **2.6 Sistemas microfluídicos para estudo de células animais**

Existe um forte apelo em mimetizar ambientes próximos aos naturais. No entanto, na macroescala (placas), ainda é dificultoso reproduzir ambientes fisiologicamente compatíveis (GUPTA et al., 2016). Devido a isso, a miniaturização de sistemas para o estudo celular complexo tem apresentando um forte interesse nas áreas biológicas e médicas (ZHENG; SHAO; FU, 2021). Sistemas microfluídicos podem ajudar a compreender diversos fatores físicos que afetam o comportamento celular em condições dinâmicas, como influência do transporte de oxigênio e tensão de cisalhamento devido ao escoamento.

Estudos utilizando células de papiloma humano (CA SKI) em microfluídica mostraram que menor é a taxa de migração celular, quando as células estão expostas a quantidade de oxigênio entre 5-15%. No mesmo ensaio, os autores analisaram o impacto do cisalhamento em tecidos vascularizados e em ductos mamários (LIN et al., 2015).

Dispositivos microfluídicos desenvolvidos para compreender a influência do cisalhamento nas células, utilizam geralmente canais independentes que são separados

por um gel ou por compartimentos individualizados (CHEN et al., 2020b). A grande vantagem em qualquer um dos modelos empregados, é que a microfluídica permite um controlar de forma homogênea o fluxo para todos os canais (SONG; MUNN, 2011).

Outro tipo de estudo foi apresentado por Patra e colaboradores (2013), que desenvolveram um dispositivo microfluídico capaz de formar e cultivar 5000 esferoides simultaneamente. Os autores utilizaram células estaminais embrionárias (ES-D3), células de hepatocarcinoma (Hep-G2) e fibroblasto epitelial de rim de macaco verde africano (COS-7). As células foram isoladas em câmaras de cultivos com geometrias propícias, obtendo agregados uniformes (PATRA et al., 2013).

Outra grande vantagem dos dispositivos microfluídicos é que eles permitem acoplar gradientes de concentração. Os gradientes de concentração auxiliam na obtenção de informações rápidas e de forma simultânea em apenas um único ensaio. Desta forma, diversas respostas bioquímicas podem ser adquiridas (inclusive com as respectivas triplicatas) em um único experimento, atuando em funções celulares básicas como: regulação de genes (*i.e.* expressão de genes bimodais ativada por proteína-quinase e por mitógenos-MAPK), metástases de câncer (WANG et al., 2004; NANDAGOPAL; WU; LIN, 2011), migração celular (IRIMIA et al., 2006; BARKEFORS et al., 2008) diferenciação (PARK et al., 2007; HOU et al., 2018), resposta imune (LI; LIU; HOFFMAN-KIM, 2008; KOTHAPALLI et al., 2011), processo de cicatrização de feridas (LIN, 2009; VAN DER MEER et al., 2010) e embriogênese (HEO et al., 2010; WENG, 2019).

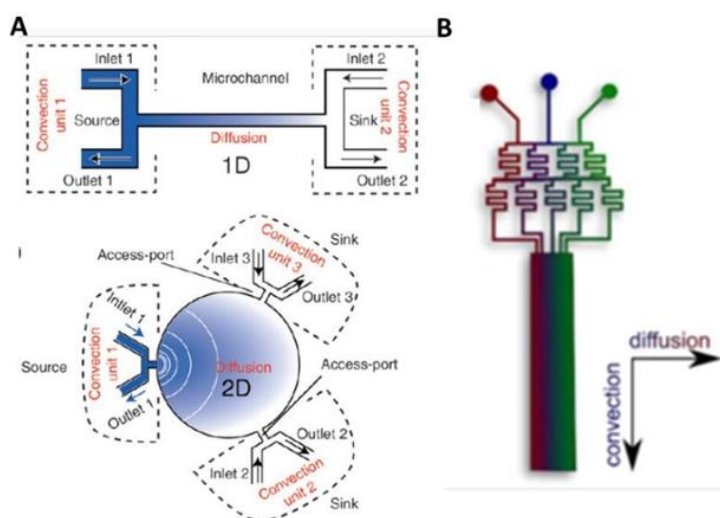
## **2.7 Gradientes de concentração para o estudo celular**

O desenvolvimento de gradientes de concentração vem sendo bastante explorado em diversas áreas (OLIVEIRA et al., 2016b; CHEN et al., 2020c; NGUYEN et al., 2021) uma das utilidades dos gradientes de concentração é avaliar os sinais bioquímicos e a mobilidade das células, quando expostas a diferentes concentrações de um reagente específico (SOMAWEERA; IBRAGUIMOV; PAPPAS, 2016). Para o sucesso nessas aplicações, é importante que os dispositivos microfluídicos sejam capazes de gerar gradientes de concentração muito similares ao que ocorre *in vivo* (WANG; LIU; PANG, 2017).

Dispositivos microfluídicos são ferramentas ideais para a criação e controle de gradientes quimiotáticos. Métodos de microfabricação permitem projetos de criação de microcanais que auxiliam na movimentação das células. As dimensões micrométricas dos canais microfluídicos favorecem o processo difusional, auxiliando a reduzir o tempo de espera para a estabilização do gradiente de concentração (WANG; LIU; PANG, 2017).

Os gradientes de concentração sempre dependem do local onde está sendo observado o fenômeno de interesse. Os dispositivos podem ser divididos em dois tipos básicos, com base do tipo de gradiente apresentado. Os microdispositivos podem apresentar geradores de gradiente convectivo, que atuam por meio do escoamento com velocidade constante dos fluídos e diferente de 0 ou podem apresentar gradiente de concentração difusivo, que acontece por meio de um gradiente de potencial químico, ocasionado pelas interações moleculares entre duas ou mais substâncias, onde a velocidade dos fluídos é praticamente nula.

Nestas circunstâncias, é possível investigar o comportamento celular tanto nos dispositivos com geração de gradiente de concentração difusivo (Figura 10 A), quanto nos convectivos (Figura 10 B). Essas características podem ser exploradas para mimetizar situações que ocorrem naturalmente ou sob condições de estresse (ATENCIA; MORROW; LOCASCIO, 2009; OLIVEIRA et al., 2016b)



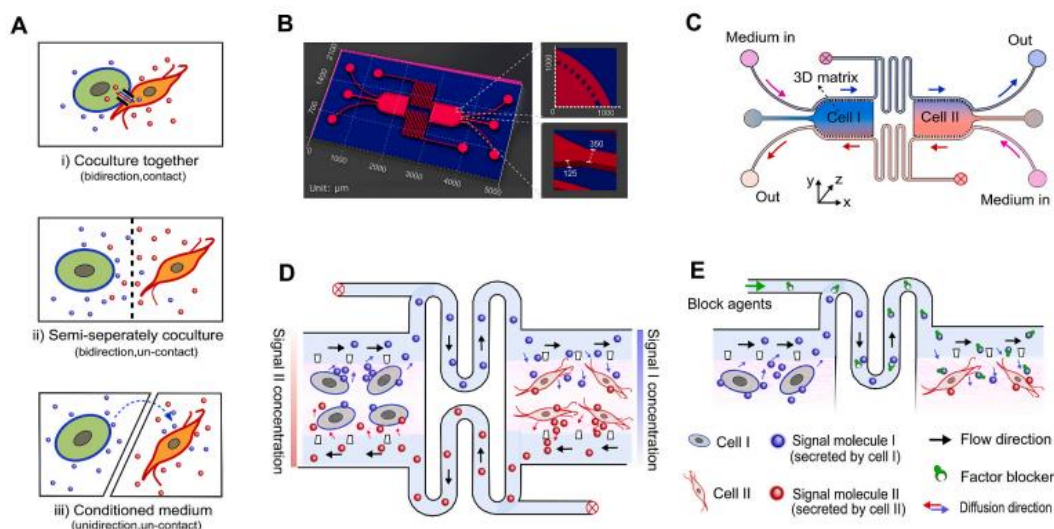
**Figura 10:** Dispositivos microfluídicos com geração de gradiente. (A) Difusivo bidimensional FONTE: ATENCIA et al (2009). (B) Convectivo. Esse modelo é denominado “árvore de natal”, uma vez que cria um gradiente de concentração uniforme. FONTE OLIVEIRA et al (2016b) imagem a, reproduzida sob a

autorização da Royal Society of Chemistry. Imagem b, reproduzida sob a autorização da John Wiley and Sons.

Na área de biologia celular, dispositivos geradores de gradientes têm grande importância, principalmente no estudo celular. Muitos tipos de células exibem a capacidade de detectar determinados sinais bioquímicos, e se movimentam na direção deles (MOSEER et al., 2004). Um exemplo de células que se movimentam por meio de sinais bioquímicos, são os leucócitos. Os leucócitos são células de defesa do organismo, que possuem a capacidade de responder a quimiocinas (pequenas citocinas que atuam receptores capazes de controlar a migração e a residência de células imunes).

Essas quimiocinas são liberadas a partir das células danificadas ou sob alto estresse. Nesse processo, as quimiocinas entram na corrente sanguínea proporcionando um sinal para os leucócitos, fazendo que estes se movimentem na direção das células, reorganizando o citoesqueleto (SCHIFFMANN, 1983; TAGER et al., 2000). O uso de um gradiente de concentração difusivo pode ser muito útil, uma vez que os leucócitos são capazes de detectar diferentes concentrações de quimiocinas para realizar os seus movimentos (JOHN; SIEBER, 1975; HADDOX et al., 2010).

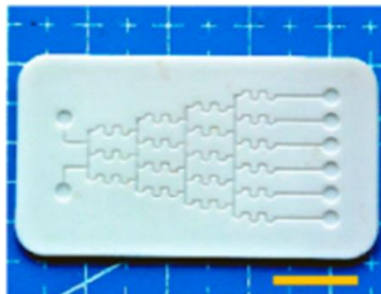
Entre o emprego do uso dos gradientes de concentração, destacam-se o uso para estudar a comunicação celular por meio de sinalizadores específicos. Fang e colaboradores (2021), construíram um microdispositivo para estudar a comunicação intercelular unidirecional por meio do controle espacial do fluxo das moléculas de sinal. O microchip contém duas câmaras separadas conectadas por dois canais onde o meio de cultura escoa de forma oposta. Um canal de bloqueio de sinal em forma de zigue-zague foi projetado para estudar a função de um sinal específico. O chip é aplicado para estudar a comunicação unidirecional entre as células tumorais e as células de estromas. Foi possível observar que a expressão de  $\alpha$ -actina de músculo liso (um marcador de fibroblastos associados ao câncer (CAF) de fibroblastos MRC-5 e células-tronco mesenquimais podiam ser reguladas positivamente apenas pela secreção de células invasivas de câncer de mama da linhagem MDA-MB-231, mas não pelas células não invasivas da linhagem MCF-7 (Figura 11) (FANG et al., 2021).



**Figura 11:** (A) Diferentes abordagens de sistema de co-culturas, para o estudo de comunicação celular: i) A co-cultura celular no mesmo microambiente, sendo a comunicação primordialmente por contato direto; ii) A co-cultura semi-separada oferece comunicação bidirecional e sem contato; iii) A transferência do meio condicionado oferece comunicação unidirecional e sem contato. (B) desenho do microdispositivo (C) o diagrama esquemático do funcionamento do microdispositivo onde, diferentes tipos de células foram cultivadas nas microcâmaras, fixadas com matriz extracelular. As setas pretas mostram as direções de fluxo do meio de cultura de uma microcâmara para outra. As entradas de bloqueio de sinal (em zigue-zague) estão próximas, ao fluxo de meio, facilitando a neutralização de um sinal específico. (D) Detalhe do funcionamento do microdispositivo de comunicação unidirecional. (E) diagrama esquemático do sistema de bloqueio de sinal. FONTE: FANG et al (2021). Imagem reproduzida sob a autorização da Elsevier.

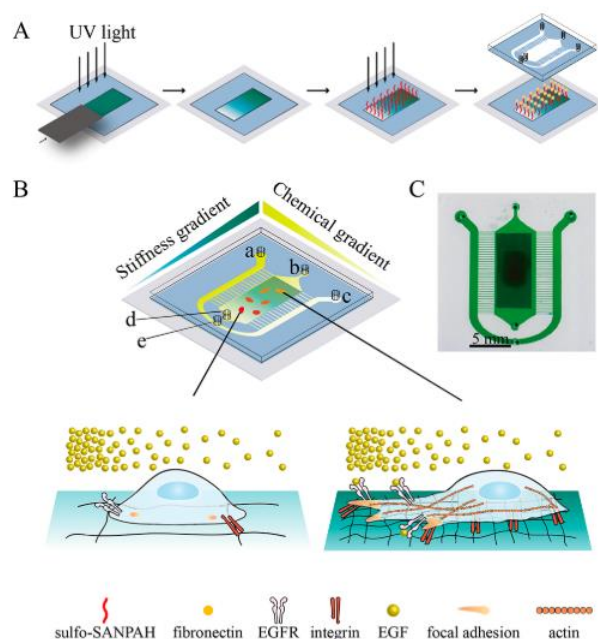
Seguindo a mesma concepção, Tang e colaboradores (2021), desenvolveram um microdispositivo utilizando como material um a hidroxiapatita (HA) e polidimetilsiloxano (PDMS). O HA é um material cerâmico bioativo que possui estrutura e composição semelhantes aos produtos da mineralização ósseas. Os autores utilizaram o HA como um componente de chip microfluídico para fornecer um ambiente ósseo altamente biônico. As diferentes geometrias de microdispositivos, baseadas no conceito de “árvore de natal”, foram impressas em HA. Para isso, foi utilizada a tecnologia de reolitografia de cerâmica (SLA), sendo a largura mínima para cada canal de 50  $\mu\text{m}$ . O substrato HA com microcanais foi selado por uma camada fina de polidimetilsiloxano (PDMS) para fazer um chip microfluídico HA-PDMS (Figura 12). Experimentos de cultura de células demonstraram que, em comparação com PDMS, HA foi mais propício para a proliferação e diferenciação osteogênica da linha de células de osteoblastos fetais humanos (hFOB). Além disso, o gradiente de concentração gerado com hidrócloridrato de doxorrubicina

(DOX), possibilitou escolher a concentração inibitória máxima ( $IC_{50}$ ) (TANG et al., 2021).



**Figura 12:** Dispositivo construído em hidroxiapatita (HA) e polidimetilsiloxano (PDMS), com gradiente de concentração convectivo modelo “árvore de natal”. O microdispositivo contém 6 canais. Neste caso, cada canal é responsável por alimentar uma câmara de cultivo. FONTE: TANG ET AL (2021). Imagem reproduzida sob a autorização da Elsevier.

No caso de dispositivos microfluídicos baseados em gradiente de concentração difusivo, Dou e colaboradores (2020), desenvolveram um microchip para observar a migração de células de glioma (U87-MG) e seus efeitos biomecânicos de acordo com a rigidez do hidrogel. Para isso, os autores construíram por litografia macia, um microdispositivo com dois andares, onde o andar superior consiste em 2 microcanais em forma de “U”, contendo no meio desse “U”, diversos microcanais, responsáveis por gerar o gradiente no andar inferior. O andar inferior era composto por uma câmara com uma entrada e uma saída com as células de glioma fixadas em um hidrogel de poliacrilamida conjugado com fibronectina (PAA). No andar superior, foi gerado um gradiente difusivo de fator de crescimento epidérmico (EGF), enquanto ao mesmo tempo era gerado um gradiente de rigidez longitudinal variando de cerca de 1 kPa a 40 kPa. Os autores observaram que, ao rastrear a migração celular, a rigidez do hidrogel promovia a quimiotaxia celular, enquanto o gradiente de EGF acelerava a migração celular (Figura 13). O estudo do aumento da rigidez do substrato na quimiotaxia celular é muito significativo para simulação em modelos *in vitro* e no estudo na área de engenharia de tecidos. (DOU et al., 2020)



**Figura 13:** (A) Diagrama esquemático da montagem microdispositivo para gerar o gradiente de rigidez em um hidrogel de PAA. (B) Comportamento das células U87-MG cultivadas em diferentes regiões de rigidez sob estimulação do gradiente EGF (C) Fotografia do dispositivo microfluídico fabricado. FONTE DOU et al. (2020). Imagem reproduzida sob a autorização da ACS Publication.

O nosso grupo de pesquisa possui experiência na construção de dispositivos que permitem a geração de gradientes de concentrações, tanto difusivo quanto convectivo. Os microdispositivos foram utilizados para explorar o comportamento de células microbianas (bactérias e leveduras) em diferentes concentrações de substrato e antibiótico (OLIVEIRA et al., 2016a; VIT et al., 2018; SOARES et al., 2019). Neste contexto, o uso de gradientes de concentração acoplados a técnicas microfluídicas podem ser muito úteis; principalmente para pesquisas envolvendo o estudo de *drug screening*. Assim, os gradientes podem contribuir para: diminuir etapas do processo, gastos com reagentes e amostras e consequentemente o tempo de repetição com experimentos.

## 2.8 Dispositivos microfluídicos para avaliação do comportamento celular na presença de fármacos (*drug screening*)

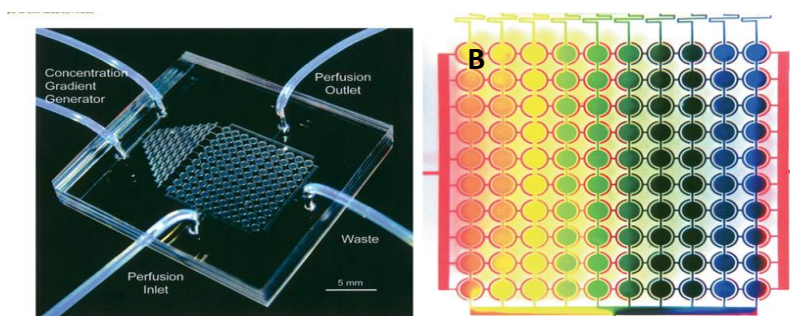
Nos últimos anos, a medicina moderna vem estudando as respostas das células tumorais a diversos quimioterápicos. No entanto, a resistência das células tumorais a certas concentrações de medicamentos impede os efeitos prolongados do tratamento, tornando um grande obstáculo para o sucesso da quimioterapia (REBUCCI; MICHIELS,

2013). Outro fator, é o custo empregado na elaboração de novos medicamentos. Segundo Dimasi et al (2016), os valores estimados mundialmente para desenvolver um novo fármaco estão casa de 2,5 bilhões de dólares anuais, sendo boa parte desses custos utilizados na primeira etapa de desenvolvimento (ensaios pré clínicos) (DIMASI; GRABOWSKI; HANSEN, 2016).

Muitas vezes, a maioria dos estudos de fármacos falham nos ensaios pré-clínicos(SHI et al., 2020). Desta forma, torna-se importante o desenvolvimento de novas estratégias que possam ser utilizadas para acelerar o desenvolvimento ou reduzir os custos de seleção de fármacos (*drug screening*). Na indústria farmacêutica é importante eliminar os medicamentos não promissores o mais rápido possível, valendo da premissa utilizada nas industrias de: “falhar cedo e falhar de forma barata. “(*fail early and fail cheaply*) (SUN et al., 2017a; ZHANG; RADISIC, 2017; ZHANG et al., 2018).

Com o intuito de diminuir esses gastos e ao mesmo tempo testar a sensibilidade *in vitro* antes do tratamento clínico, a microfluídica pode atuar como ferramenta poderosa, capaz de selecionar concentrações eficazes de um ou mais fármacos para a diversas terapias.

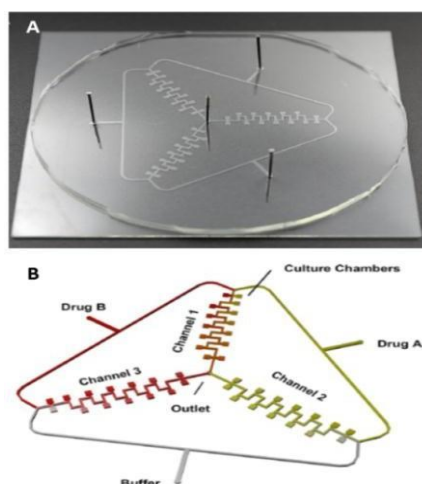
A microfluídica acoplada a gradientes de concentração, pode auxiliar de forma substancial o estudo da resposta celular na presença de diferentes concentrações de um fármaco. Nesse contexto, Hung e colaboradores (2005) desenvolveram uns dos primeiros sistemas para o estudo de *drug screening* (Figura 14). O dispositivo foi projetado de forma a integrar os processos utilizados em culturas convencionais de células em um único sistema microfluídico autônomo (HUNG et al., 2005).



**Figura 14:** (A) Dispositivo para células 2D com gradiente de concentração convectivo, (B) Geração do gradiente nas diferentes câmaras de cultivo. FONTE: HUNG et al (2005). Imagem reproduzida sob a autorização da JohnWiley and Sons.

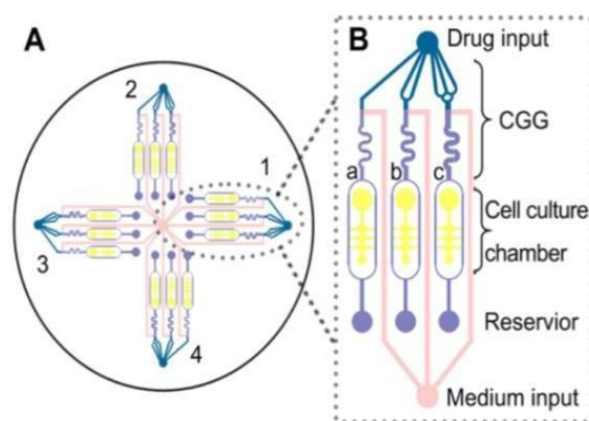
Dentre as principais funções do dispositivo destacam-se o estudo do crescimento celular, observação do efeito dos reagentes nas células em tempo real. O dispositivo apresentado na Figura 13 consiste em uma única unidade contendo câmaras microfluídicas conectadas a múltiplos canais de perfusão. Esses canais são responsáveis por gerar gradiente de concentração convectivo. O dispositivo possui duas entradas para as células, duas entradas para reagente e uma saída para fluidos. Para os experimentos, os autores utilizaram células de carcinoma humano (HeLa), cultivadas dentro do dispositivo na conformação 2D. com. Após as células atingirem a confluência de  $2,5 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup>, elas foram marcadas com um corante fluorescente e foi avaliada em tempo real, a avaliação da concentração ótima de fármaco em cada câmara de cultivo. As células foram observadas em microscopia de fluorescência, monitorando a resposta em relação à concentração de fármaco.

Atualmente, muitos tipos de microdispositivos foram construídos pensando na importância de testar combinações de diferentes medicamentos de forma simultânea. Sun et al, (2017) desenvolveram um microdispositivo, contendo 36 câmaras de cultivo ao total (12 em cada modulo), que estavam conectadas a três canais. Em dois dos canais foram adicionado um fármaco específico, e no terceiro canal foi adicionado apenas uma solução salina, gerando um gradiente de concentração difusivo nas câmaras. A geração de gradiente de concentração, possibilitou gerar concentrações de cada um dos fármacos isolado e combinados (Figura 15). Como prova de conceito, os autores testaram os fármacos cisplatina e paclitaxel, usualmente utilizados em terapia para câncer, em células epiteliais de adenocarcinomas basais alveolares humano (A549) (SUN et al., 2017a).



**Figura 15:** Dispositivos microfluídicos para triagem de fármacos. Microdispositivo utilizado para *screening* de dois fármacos, utilizando como ferramenta um gradiente de concentração convectivo. FONTE SUN et al (2017). Imagem reproduzida sob a autorização da Springer Nature.

O apelo das culturas 3D fez com que fossem desenvolvidos dispositivos capazes de mimetizar microambientes mais próximos ao ambiente *in vivo*. Xu et al (2013) projetaram um dispositivo microfluídico para cultivo 3D com o intuito de testar a sensibilidade das células em diferentes concentrações de fármacos (Figura 16). Os autores estudaram um sistema de co-cultura, utilizando linhagens primárias de câncer mono-pulmonar e de câncer estromal gástrico. As células de câncer de pulmão foram cultivadas em no formato 3D, sob perfusão contínua de meio de cultura, imitando o microambiente tumoral *in vivo*. As linhagens foram tratadas com anticancerígenos em diferentes condições simultaneamente, utilizando gradiente de concentração convectivo dentro das câmaras de cultivo. Dessa forma, os autores conseguiram verificar as possíveis concentrações de quimioterápicos que afetavam substancialmente a viabilidade das células tumorais (XU et al., 2013).

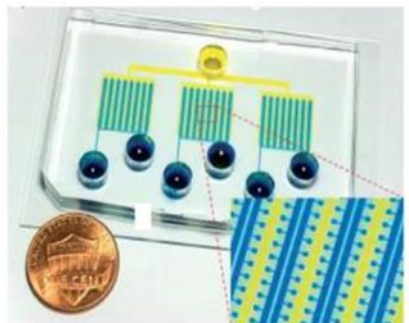


**Figura 16:** Dispositivo para cultivo de co-culturas celulares na conformação 3D com geração de gradiente convectivo. O dispositivo dispõe de uma entrada para fármaco, conectada a três canais que geram um gradiente convectivo nas câmaras de cultivo. As câmaras de cultivo foram construídas em triplicatas, e possuem uma saída para cada conjunto de câmaras. Conectada em paralelo a essas câmaras, há canais responsáveis por levar as células até as câmaras e o meio de cultivo. FONTE: XU et al (2013). Imagem reproduzida sob a autorização da Elsevier.

A criação de sistemas microfluídicos para estudo de respostas celulares, que permitam acoplar os microdispositivos em equipamentos como leitores de microplacas, tem atraído atenção da comunidade médica. Essas plataformas possibilitam o cultivo e análise de células por um período prolongado. Neste contexto, Kwapiszewska et al (2014) desenvolveram um dispositivo microfluídico, intitulado *SpheroChip*. Ele consiste em microcâmaras de cultura de células conectadas com um gerador de gradiente de concentração. Para o estudo os autores utilizaram as linhagens de adenocarcinoma de cólon (HT-29) e células de hepatocarcinoma (Hep-G2) como modelo. As células foram cultivadas com sucesso na forma de esferoides tumorais no *SpheroChip* e atividade metabólica foi monitorada durante duas semanas, utilizando métodos fluorimétricos *in situ*. Os autores também observaram a resposta celular a um fármaco anticancerígeno, analisando as mudanças dinâmicas nas atividades metabólicas das culturas após dosagem do fármaco (KWAPISZEWSKA et al., 2014a).

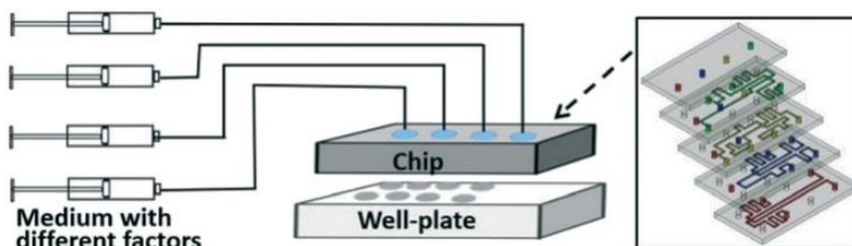
A microfluídica ainda facilita o estudo da resposta bioquímica gerada por uma única célula (*single cell*), por meio da observação do comportamento de cada célula de forma individual (Figura 17). Primeiramente, as células foram isoladas em uma matriz extracelular (ECM), criando um ambiente 3D, altamente favorável para a proliferação

celular. Além de observar o comportamento celular perante pequenas concentrações de medicamento (ZHANG et al., 2016).



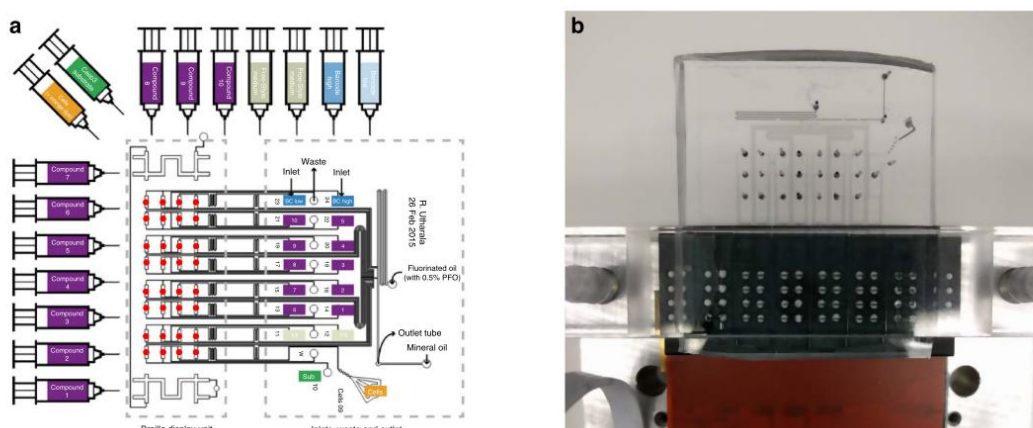
**Figura 17:** Dispositivo para estudo *single cell 3D*, para estudo de respostas bioquímicas a uma concentração e fármaco FONTE: ZHANG et al (2016). Imagem reproduzida sob a autorização da Royal Society of Chemistry.

Li et al (2021) desenvolveram um microchip reutilizável em PMMA, contendo multicamadas de alto rendimento para a triagem combinatória de fármacos em esferoides tumorais. O microdispositivo consiste em uma camada de entrada e várias camadas de dispersão, onde diferentes amostras podem ser carregadas simultaneamente no andar superior e no andar inferior é composto por um sistema de poços, onde os esferoides tumorais são adicionados. As soluções de amostra fluem para as camadas de dispersão para gerar várias combinações (Figura 18). Como prova de conceito, foram utilizadas as linhagens de câncer testicular de camundongos (F9) e de epitelial carcinoma humano (HeLa). O microchip foi utilizado para identificar os fatores críticos relacionados ao crescimento dos esferoides. Os autores testaram diferentes concentrações de L-glutamina, D-glicose, FBS e cisplatina, para estudar a autofagia dos esferoides; eles notaram que D-glicose pode inibir os efeitos da cisplatina nos esferoides tumorais, e por sua vez, a cisplatina causa autofagia severa nos esferoides em comparação com células de monocultura 2D (LI et al., 2021).



**Figura 18:** Diagrama esquemático do microdispositivo com as diferentes camadas de dispersão de fármacos, construída de PMMA.FONTE LI et al (2021).

Dispositivos com sistemas complexos utilizando válvulas, por exemplo, podem ser utilizados para testar diferentes combinações de medicamentos de uma única vez. Eduatti e colaboradores (2018), criaram uma plataforma microfluídica com um conjunto de válvulas, que permite realizar um sistema *higher throughput*, utilizando células retirada de biópsias de pacientes com câncer de pâncreas e tumores primários de diferentes órgãos (Figura 19). Os autores testaram 10 compostos e mais 2 meios de cultura simultaneamente. As análises dos dados obtidos foram realizadas utilizando *software LabView*. Dessa forma, os autores conseguiram estimar as melhores combinações de fármacos para cada tipo de células analisadas (EDUATTI et al., 2018).



**Figura 19:** Diagrama do funcionamento do microdispositivo: (a) Design de chips. O microchip permite utilizar 16 seringas no total, nesse caso foram utilizadas amostras aquosas, conectadas às entradas no microchip por meio dos microcanais. O display braille é usado para controlar as válvulas (círculos vermelhos) e regular o fluxo proveniente das seringas de fase aquosa, resultando em diferentes combinações. Os plugues são coletados em um tubo conectado à saída. (b) Configuração experimental do microchip em um display Braille alinhando os canais microfluídicos com as válvulas braille. FONTE: EDUATTI et al (2018). Imagem reproduzida sob a autorização da Royal Society of Chemistry.

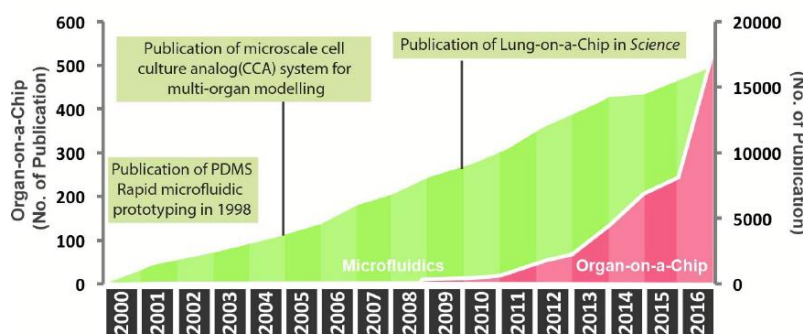
Atualmente, já existem plataformas microfluídicas mais complexas, conhecidas como *Organ on a Chip*. Essas plataformas tem a possibilidade de mimetizar um tecido e /ou órgão, obtendo respostas locais bastante precisas. Essas plataformas podem ser utilizadas para testes citotoxicidade de um fármaco em um órgão específico.

## 2.9 Organ on a Chip (OoaC)

A microfluídica por ser uma plataforma versátil, utiliza pouco reagentes, é capaz de mimetizar ambientes próximos aos *in vivo*, acabou se tornando muito atrativa para plataformas de *Organ on a Chip* (OoaC).

Os OoaCs são plataformas multidisciplinares, que unem a microfluídica com a engenharia de tecidos, além de combinar uma gama de conhecimentos (biologia, química e ciência dos materiais)(BANG et al., 2019; WU et al., 2020) em uma única tecnologia. Por ser uma tecnologia promissora em 2016, os OoaCs foram apontados dentre as “Dez principais tecnologias emergentes” no Fórum Econômico Mundial (CANN, 2016). De uma forma resumida, os OoaCs são sistemas biomiméticos que podem imitar ambientes fisiológicos em escala micrométrica.(CHOI; SANTHOSH; CHOI, 2020; LOW et al., 2021)

Nos últimos anos, o aumento por tecnologias que, possam prever com maior confiabilidade os efeitos dos medicamentos na fisiologia humana, vem se tornando cada vez mais relevante, como pode ser observado na Figura 20 (ZHANG; RADISIC, 2017).

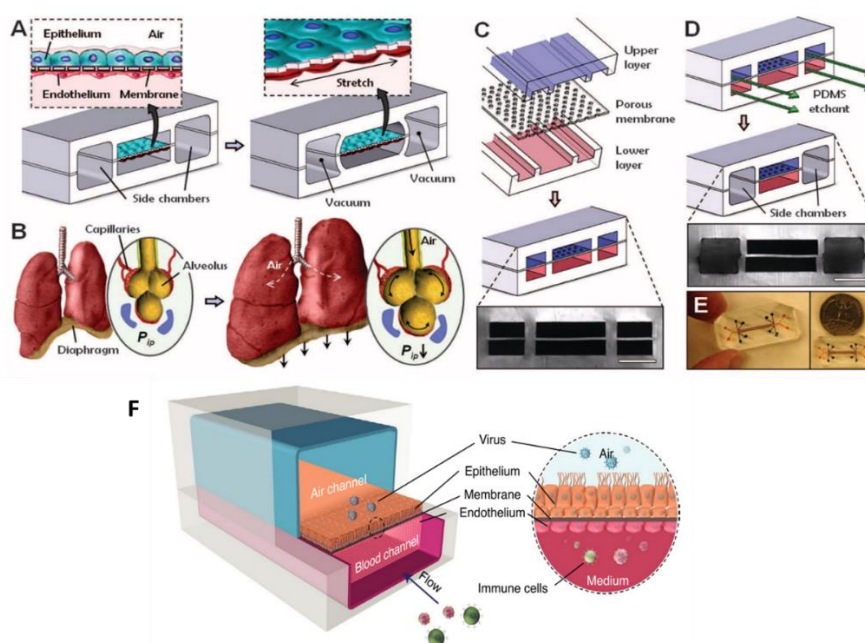


**Figura 20:** Número de publicações de trabalhos envolvendo o desenvolvimento dos OoaCs ao longo dos anos. FONTE (ZHANG; RADISIC, 2017). Reproduzido sob a autorização Royal Society of Chemistry.

Entre as principais motivações para o desenvolvimento dos OoaCs, estão os avanços na área biológica, principalmente na compreensão do metabolismo de células-tronco. Essa compreensão, auxiliou a acelerar ainda mais o progresso neste campo, fornecendo fácil acesso a linhagens de células-tronco específicas, tornando esta tecnologia extremamente relevante para compreender o que ocorre *in vivo*. Além disso,

os OoCs podem modelar a interface tecido- tecido e simular dinamicamente o que ocorre nos órgãos. Todas essas atribuições, são chaves para prever de forma precisa as respostas dos medicamentos *in vivo*.(ZHANG; RADISIC, 2017; KIMURA; SAKAI; FUJII, 2018; ZHANG et al., 2018).

Atualmente, com a pandemia ocasionada pelo coronavírus, são requeridas abordagem mais eficazes para acelerar o desenvolvimento de medicamentos e profiláticos eficazes. Assim, sistemas *lung on a chip*, são alternativas sustentáveis para testes de novos medicamentos (Figura 21Figura 20). Si e colaboradores (2021), utilizaram a plataforma já desenvolvida pelo grupo de pesquisa (HUH et al., 2010) para avaliar a eficácia de possíveis candidatos a medicamentos profiláticos ao Covid 19. Os autores inocularam no microchip o vírus (COVID 19) e testaram uma gama de medicamentos (Amodiaquina, Toremifeno, Clomifeno, Cloroquina, Hidroxicloroquina, Arbidol, Verapamil, Amiodarona, Desetil amodiaquina e Cmax), os resultados obtidos pelos autores foram bem próximos que resultados prévios em grupo de controle, onde nenhum dos medicamentos testados apresentaram significativamente melhora do quadro de infecção(SI et al., 2021).

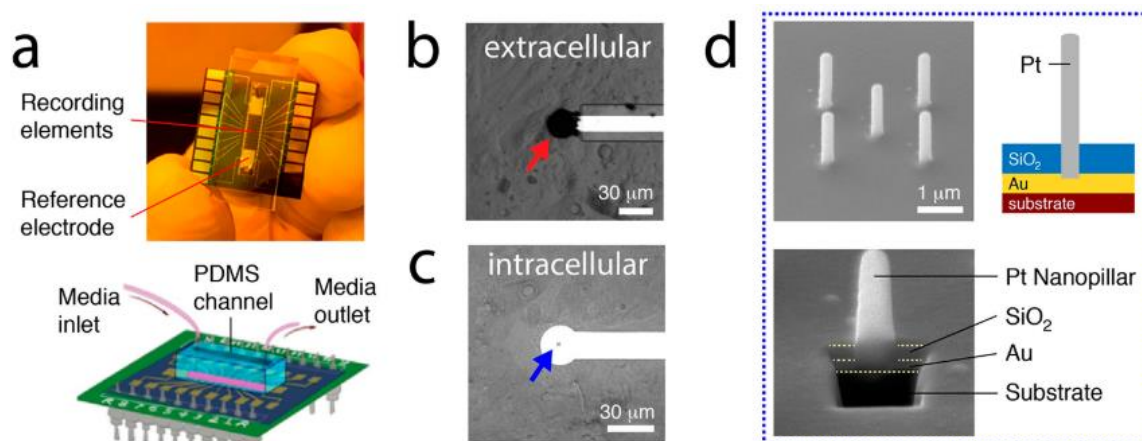


**Figura 21:**Pulmão on a chip, microdispositivo que mimetiza a respiração humana. (A) O microfabricado em PDMS, contendo microcanais compartimentados para formar a barreira alveolar-capilar, ente os canais há uma membrana flexível e porosa de PDMS, revestida com matriz extracelular. (B) Ilustração

demonstrando o processo de inalação, como que ocorre nos pulmões, as contrações do diafragma causam uma redução na pressão intrapleural, levando à distensão dos alvéolos e alongamento da interface alvéolo-capilar. (C) Três camadas de PDMS são alinhadas e irreversivelmente ligadas para formar dois conjuntos de três microcanais paralelos separados por uma membrana de PDMS de espessura de 10 mm. Barra de escala, 200 mm. (D) Após a ligação permanente, é aplicado um sistema de vácuo, onde a membrana entre canais, sofre um estiramento mecânico. Barra de escala, 200 mm. (E) Vista superior do dispositivo microfluídico. (F) Diagrama esquemático do sistema *Air on a chip*, após a inoculação do vírus. FONTES Imagens A-E, HUH et al (2010) e Imagem F, SI et al (2021). Imagem A-E reproduzido sob a autorização de AAAS Imagem I reproduzido sob a autorização Springer Nature.

A plataforma também permite estudar o comportamento de sistemas mais complexos, como o sistema cardiovascular. De acordo com dados estatísticos, as doenças cardíacas como enfarte do miocárdio, hipertrofia e aterosclerose 34% das mortes mais comuns em todo o mundo (JASTRZEBSKA; TOMECKA; JESION, 2016; PHARMACEUTICAL INDUSTRY PROFILE, 2016). Microsistemas que permitam estudar o processo de oclusão coronária, como o trabalho reportado por Liu et al (2020), são de grande importância para compreender o fenômeno e como proceder.

Os autores desenvolveram um *heart on a chip* bioeletrônico, onde foi possível recriar situações de hipoxia aguda. O sistema conta com um canal microfluídico que permitiu a modulação rápida da oxigenação média, que imitou os regimes induzidos por uma oclusão coronária temporária. Para o estudo foram utilizadas as células cardíacas HL-1, como, células modelos (Figura 22). O sistema bioeletrônico forneceu leituras contínuas, demonstrando que as células com hipoxia apresentavam um período inicial de taquicardia seguido por uma redução na taxa de batimento, e eventualmente arritmia. O sistema auxilia a compreender sistemas com hipóxia coronária, e os resultados obtidos podem ser utilizados para o desenvolvimento de novos medicamentos(LIU et al., 2020a).



**Figura 22:** Plataforma heart-on-a-chip. (a) (superior) Imagem óptica e esquema (inferior) ilustração do chip totalmente montado com todos os elementos integrados, eletrodo de referência e canal em PDMS. (b) Imagem óptica representativa de um elemento extracelular revestido com platina em preto (seta vermelha). (c) Imagem óptica representativa de um elemento de gravação intracelular fabricado em ouro contendo cinco nanopilares verticais em platinas verticais (seta azul). (d) (topo) Detalhe em MEV dos cinco nanopilares verticais (inferior) Seção transversal de um único nanopilar. FONTE LIU et al (2020). Imagem reproduzida sob a autorização ACS Publications.

Os OoaCs, ainda podem atuar em sistema para mimetizar a fertilização *in vitro* animal, auxiliando a compreender fatores determinantes que ocorrem durante a fecundação (e.g sinalizadores), ou mesmo sistemas mais complexos, sistemas neurais, para o estudo de doenças neurodegenerativas como Alzheimer e a doença de Parkinson. Possibilitando compreender o funcionamento de diversos órgãos e tecidos (KASHANINEJAD; SHIDDIKY; NGUYEN, 2018; BANG et al., 2019; CHOI; SANTHOSH; CHOI, 2020; FERRAZ et al., 2020).

Apesar das diversas vantagens apresentadas pelos OoaCs, ainda é uma realidade pouco distante a substituição de modelos animais para o estudo de desenvolvimento de fármacos, para a utilização dos OoaCs. Embora os OoaCs obtenham respostas satisfatórias sobre o funcionamento de um órgão específico, faltam dados da interação do fármaco com os outros órgãos. A desenvolvimento de um *multi-organ on a chip model* ainda é muito complexo. No entanto, o emprego de sensores nos sistemas podem ser utilizados para avaliar de forma significativa potenciais fármacos, diminuindo os custos

e tempo para lançamento de um novo medicamento (KIMURA; SAKAI; FUJII, 2018; ZHANG et al., 2018; INGBER, 2020).

## **2.10 Conclusão**

A microfluídica por meio das imensuráveis possibilidades de atuação apresenta-se como uma plataforma tecnológica promissora para compreender os fenômenos que ocorrem em nível celular, permitindo aplicações avançadas para os estudos de tratamentos individualizados para os mais diversos tipos de tumores.

Além disso, pode favorecer e acelerar os ensaios pré-clínicos de novos fármacos. Essas características, são fundamentais para o desenvolvimento de novas tecnologias, capazes de responder questões bioquímicas, impossíveis de observar na macroescala e em tempo real. Diapositivos capazes de atuar de forma rápida, com baixo custo e principalmente possibilite o estudo de diferentes processos celulares, que ocorrem em sistemas biológicos são extremamente vantajosos comparados com o método tradicionais e com alguns microdispositivos. Nos próximos capítulos iremos apresentar um microdispositivo inovador, de fabricação rápida e de baixo custo e com a possibilidade de reutilização.

---

## Capítulo 3 -Material e Métodos

---

### **3.1 Material**

Polidimetilsiloxano laminado (PDMS<sub>LAM</sub> Rogers Corporation, Chandler, AZ USA) e polidimetilsiloxano convencional (PDMS, Sylgard184 Silicone Elastomer Kit, Dow Corning, Midland,MI,USA), lamina de vidro (Corning, New York City, NY USA), Meio de cultivo Roswell Park Memorial (RPMI, Sigma Aldrich, St. Louis , MO,USA), Poli L-lisina (PLL, Sigma Aldrich, St. Louis, MO,USA), Pluronic 127F(Termofisher Scientific, Waltham,MA, USA) , enzima Dispase II (Sigma Aldrich, St. Louis, MO,USA), Tripsina EDTA 0,25% (Sigma Aldrich, St. Louis , MO,USA), soro fetal bovino (SFB, Sigma Aldrich, St. Louis , MO,USA), antibiótico estreptomicina (Sigma Aldrich, St. Louis , MO,USA), Matriz extracelular - Matrigel® (Corning, New York City, NY USA), marcadores: 4',6'-diamino-2-fenil-indol (DAPI, Sigma Aldrich, St. Louis , MO,USA), Tetramethylrhodamine B isothiocyanate phalloidin (Sigma Aldrich, St. Louis, MO,USA), dimetilsulfóxido (DMSO- Sigma Aldrich, St. Louis , MO,USA), Kit Viability/Citotoxicity Live and Dead Probe (Termofisher Scientific, Waltham,MA, USA) e azul de Tripán 0,4% (Sigma Aldrich, St. Louis , MO,USA),kit para ensaio de morte celular Annexin V /PI (Annexina V e Iodeto de propídeo- Sigma Aldrich, St. Louis , MO,USA). garrafas para cultura de células (área de cultivo 72 cm<sup>2</sup>, Kasvi, São José dos Pinhais, PR, Brasil), placas de 24 poços (área de cultivo 3,87 cm<sup>2</sup>, Kasvi, São José dos Pinhais, PR, Brasil), Phosphate-Buffered Saline(PBS) e Di-Phosphate-buffered saline (DPBS)( Sigma Aldrich, St. Louis , MO,USA), câmara de Neubauer (Kasvi, Campinas, SP, Brasil), placas de vidro para cultivo de esferoides, sistema Lab-TekII Sistema Chamber Slide (placa com 8 poços-0,7 cm<sup>2</sup>- Termofisher Scientific, Waltham,MA, USA), fármacos: hidrocloreto de doxorrubicina e paclitaxel (Sigma Aldrich, St. Louis , MO,USA), reagente enzimáticos: Glucose God-Pap, Liquid Stable (Biolabo, Maizy,France) e LDH Cytotoxicity Assay (BioVision/Abcam- Waltham, MA,USA). Reagentes: Fenoltaleína (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), Hidróxido de potássio (KOH- 0,01 M- Sigma Aldrich, St. Louis , MO,USA).

## **3.2 Métodos**

### **Análises do material (PDMS<sub>LAM</sub>)**

#### **3.2.1 Composição química da superfície do material - Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X (XPS)**

Para avaliar a composição química da superfície do PDMS laminado e do PDMS convencional, foi utilizada a técnica de espectrometria de fotoelétrons excitados por raios X (XPS). O espectrômetro de XPS é composto de uma câmara de ultra- vácuo, uma fonte de raios X, um canhão de íons, um canhão de elétrons, um manipulador de amostras, um analisador de elétrons e um computador. Um dispositivo de inserção é usado para trocar as amostras sem quebrar o vácuo. O canhão de íons é usado para limpeza das amostras e para análises de perfilamento de composição. Foi utilizado o espectrômetro XSAM H (Kratos Analytical Manchester,UK), para análise de duas amostras de cada um dos materiais (PDMS<sub>LAM</sub> e PDMS, dimensões de 2x2 mm). Essa análise varre a superfícies de cada material, identificando os elementos químicos presentes no elastômero.

#### **3.2.2 Ângulo de contato**

Para avaliar se os materiais utilizados possuem caráter hidrofóbico ou hidrofílico, foi realizada a avaliação da tensão superficial, por meio da determinação do ângulo de contato formado entre o material e o solvente utilizado. Para essa análise, foi utilizado um tensiômetro K12 (Krüss Scientific Instruments Inc, Hamburg, HH, Germany). As amostras foram fixadas em uma lâmina de vidro (24x76 mm) e foram cortadas de forma a cobrir todo o comprimento da lâmina. Em seguida, as amostras foram posicionadas no tensiômetro, o qual consiste em uma agulha de platina contendo solvente que se deseja testar (ambos os polímeros foram testados com relação à água ultrapura). A agulha do tensiômetro desce até a amostra e goteja uma gota do líquido (cerca de 1 mm de diâmetro) sobre o material. O ângulo formado entre a gota e o material (ângulo de contato) é

quantificado, permitindo avaliar o caráter mais ou menos hidrofílico ou hidrofóbico do material.

### 3.2.3 Resistência do material à temperatura e à esterilização.

Para avaliar a dilatação térmica do material com o aumento da temperatura, foram utilizadas amostras de PDMS<sub>LAM</sub> e PDMS convencional curado (em estado sólido). Cada amostra foi cortada na dimensão de 2x2 mm para facilitar a sua observação por microscopia óptica (Nikon Ti Eclipse, Nikon Instruments Inc, Melville, NY, USA). As amostras foram posicionadas sobre uma placa de aquecimento, e submetidas a temperaturas entre 20 a 200°C (as amostras permaneceram durante 15 minutos em cada temperatura, garantindo o equilíbrio térmico).

Após expostas a cada temperatura, as amostras foram resfriadas à temperatura ambiente, e mais uma vez observadas no microscópio. O objetivo era a avaliação da influência da temperatura sobre propriedades estruturais dos polímeros, em especial a presença da dilatação permanente. Para verificar dilatação com o aumento da temperatura, foi realizado o seguinte cálculo (Equação 1):

$$\Delta S = S_0 - S_f \quad (1)$$

Onde:

$\Delta S$ =Dilatação linear do elastômero com a temperatura (%)

$S_0$ =Área inicial do elastômero (mm<sup>2</sup>)

$S_f$  = Área final do elastômero (mm<sup>2</sup>)

Para verificar se o elastômero sofre alguma mudança na sua morfologia com processo de esterilização (utilizando calor úmido-autoclave), outras duas amostras de cada um dos materiais (PDMS laminado e PDMS convencional, dimensões de 2x2 mm) foram preparadas. Assim como na análise de temperatura, as amostras foram avaliadas por microscopia óptica antes do experimento. A seguir, foram posicionadas no interior de um tubo de vidro e submetidas a 5 ciclos de autoclavagem. Cada ciclo teve duração de

aproximadamente 30 minutos, sendo as amostras mantidas a 1 atm e 121 °C. Após o fim dos 5 ciclos, as amostras foram resfriadas e avaliadas novamente por microscopia. A taxa de dilatação foi calculada utilizando-se a Equação 1, para avaliar se a exposição às condições comuns de esterilização causa deformação permanente.

Ao final dos processos de esterilização por temperatura e calor úmido, também foi verificado a adesão do material ao vidro. Para verificar se os processos aplicados, mudariam as propriedades adesivas do polímero (PDMS<sub>LAM</sub>).

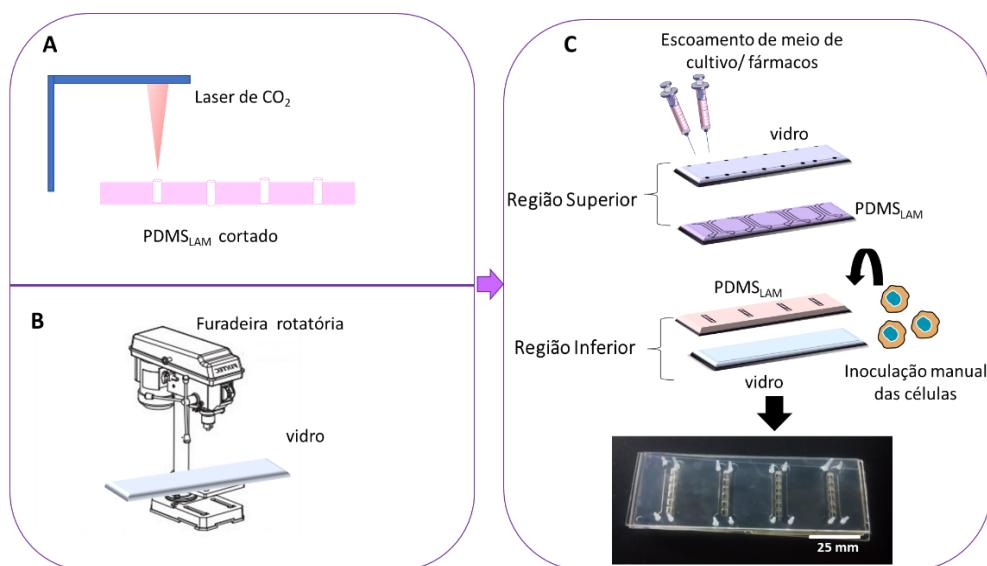
#### 3.2.4 Avaliação da morfologia do PDMS<sub>LAM</sub> e PDMS curado

A análise morfológica dos materiais foi realizada utilizando-se a técnica de microscopia eletrônica de varredura (EVO MA 15, Zeiss, Oberkochen, Germany- equipado com canhão termoiônico LaB6) para a obtenção de imagens formadas por elétrons secundários. As amostras foram preparadas com revestimento de ouro, utilizando-se um Sputter Coater Bal-Tec SCD (Baltec-Jundiaí, SP-Brasil) sob regime de alto vácuo.

### **Construção do microdispositivo**

#### 3.2.5 Construção do microdispositivo

Os canais e as câmaras de cultivo foram construídos em PDMS laminado (PDMS<sub>LAM</sub>), por meio de ablação a laser de CO<sub>2</sub>. Primeiramente, a geometria do dispositivo foi desenhada utilizando-se o software Corel Draw® (Corel Corporation, Ottawa, Canada). A técnica de ablação foi empregada para fazer o recorte do PDMS de acordo com a geometria projetada. Para isso, laser de CO<sub>2</sub> (L-Solution 100, Gravograph, Duluth, GA, USA), na potência de 20 W e velocidade de 40 mm.s<sup>-1</sup> é focalizado sobre a amostra, reproduzindo o desenho de projeto. A parte superior, a tampa e a base do microdispositivo foram construídos em vidro. A tampa possui furos de aproximadamente 1,5 mm para facilitar a acoplagem de mangueiras (Figura 23). Para furar a tampa, foi utilizada uma furadeira modelo Dremel (Bosch, Stuttgart, Germany)



**Figura 23:** Diagrama esquemático da construção do microdispositivo. (A); Utilização da técnica de ablação a laser de CO<sub>2</sub>, para cortar a geometria dos canais e das paredes das câmaras de cultivo (em PDMS<sub>LAM</sub>). A tampa no qual as mangueiras são acopladas foram furadas com furadeira rotativa modelo Dremel. (C) Desenho das partes do microdispositivo dividido em Região Superior (tampa e microcanais) e Região inferior (parede e base das microcâmaras de cultivo), imagem do microdispositivo totalmente montado.

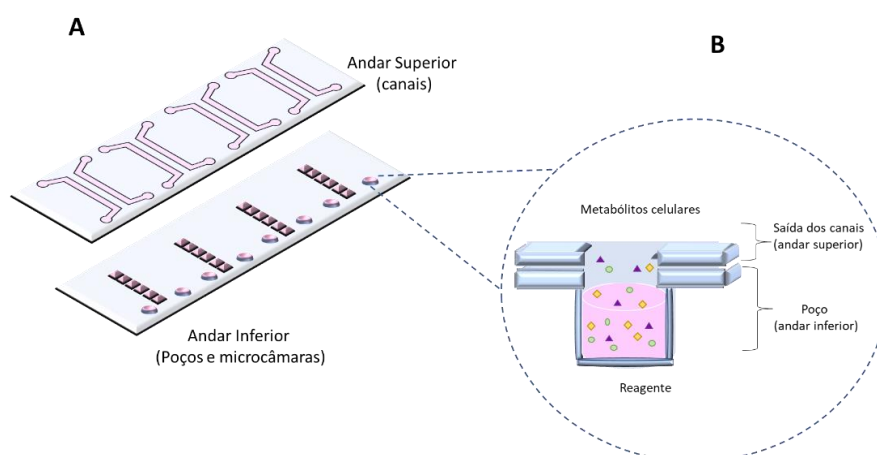
### 3.2.6 Tratamento da superfície do dispositivo com poli L-lisina (PLL)

Com o intuito de melhorar a adesão celular na base das câmaras de cultivo (vidro), foi realizado o tratamento de superfície, utilizando uma solução aquosa de poli L-lisina 0,1. Para isso, deve ser feita a esterilização das lâminas sobre as quais a solução de poli L-lisina deve ser depositada. Primeiramente, as lâminas foram higienizadas com detergente neutro, enxaguadas com água estéril e, em seguida, lavadas brevemente com álcool 70%. Após o processo de higienização, as lâminas foram expostas à luz UV por 20 minutos. A solução de poli L-lisina foi gotejada de forma a gerar um filme homogêneo por toda a superfície do vidro. As lâminas com poli L-lisina foram deixadas em fluxo laminar por 24h para secar. Após esse período, as mesmas foram expostas novamente (agora com o filme de poli L-lisina) à luz UV por 20 minutos, de modo a serem esterilizadas.

Além do tratamento com PLL, foi realizada uma segunda etapa onde para evitar a adesão das células nas paredes das câmaras de cultivo, que são construídas de PDMS<sub>LAM</sub>. Estas foram tratadas com uma solução aquosa de Pluronic 127F. Primeiramente, foram diluídos 2 g de Pluronic 127F em 10 mL de DMSO, na temperatura de 50 °C sob agitação constante, durante 30 minutos, formando assim a solução estoque de Pluronic. Uma alíquota da solução estoque de Pluronic 127F, cerca de 1 mL, foi diluída em 10 mL de água destilada estéril. As paredes das microcâmaras foram submergidas na solução aquosa de Pluronic 127F por um tempo de 60 min, após esse período as paredes das microcâmaras foram secas e então, microdispositivo foi montado (base e parede das microcâmaras). As microcâmaras foram esterilizadas em luz UV por 20 minutos. Com as câmaras tratadas, o dispositivo foi totalmente montado (base, parede, canais e tampa) e utilizado normalmente.

### 3.2.7 Construção do microdispositivo com poços para coleta

Com intuito de melhorar o microdispositivo e torná-lo ainda mais funcional, foi realizada algumas pequenas mudanças no desenho do microdispositivo. Foram adicionados na segunda camada do microdispositivo micropoços, que ficam localizados nas extremidades dos microcanais. O microdispositivo possui 8 micropoços (um para cada extremidade dos canais (Figura 24). Os micropoços possuem 4 mm de raio e 1,5 mm de profundidade. Em cada um dos micropoços foi adicionado o reagente enzimático, permitindo que a reação ocorra em tempo real e então por meio do leitor de placas, mensurar a quantidade de lactato desidrogenase (LDH), liberado ao longo de 180 min. O tamanho dos poços, também foi pensado para que, futuramente, possibilite outras análises, que possam ser mensuradas em tempo real, por meio de sensores. A técnica utilizada para fazer os reservatórios, também foi a ablação a laser CO<sub>2</sub> e a base dos reservatórios foi tratada com poli L-lisina, para facilitar a análise do LDH.



**Figura 24:** Diagrama esquemático do microdispositivo; (A) Microdispositivo separado por andares. No andar superior contém os canais, cada um contendo duas entradas e duas saídas. Os canais são responsáveis por levar nutrientes e fármacos até as células. As células por sua vez, estão situadas no andar inferior, onde contém as microcâmaras, onde as células foram inoculadas e os poços, que ficam exatamente na saída dos canais. (B) Vista lateral dos poços. Nos poços são adicionados os reagentes, que irão reagir com um ou mais metabolitos excretados pelas células.

### 3.2.8 Verificação do microdispositivo

A verificação do emprego dos micropoços foi realizada primeiramente utilizando com fenolftaleína, sensível a pH, permitindo monitorar a mudança de cor (reagente incolor que ao reagir com meio básico, torna-se rosáceo).

Foram adicionados 2  $\mu\text{L}$  de uma solução aquosa de fenolftaleína (1% m/v) em cada um dos poços situados no andar inferior do microdispositivo. Após, foi escoado em cada um dos canais uma solução de hidróxido de potássio (KOH- 0,01 M), por 45 min com uma vazão constante de  $7 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ .

A concentração de KOH, que reage com a fenolftaleína foi calculada para cada minuto, utilizando o cálculo estequiométrico de titulação, onde a concentração (mol/L), será razão entre a molaridade do KOH, dividida pelo volume consumido em cada tempo. Após obter as concentrações em cada tempo, as mesmas foram transformadas em g/ mL e comparadas com a intensidade (em pixel) das imagens dos poços com fenolftaleína(VIT et al., 2021a).

### **Preparo dos quimioterápicos**

#### **3.2.9 Preparo dos fármacos**

Os fármacos foram preparados de acordo com o protocolo de preparo de fármacos de Lacy et al.(2009). O hidrocloreto de doxorubicina (DOX) foi diluída em água de injeção (solução estoque 1 mg. mL<sup>-1</sup>). No caso do fármaco paclitaxel (PXT), o mesmo foi diluído em uma solução estoque (1 mg. mL<sup>-1</sup>), contendo 0,9% de soro fisiológico e 5% de soro glicofisiológico (5 % de glicose e 0,9% de cloreto de sódio). A mistura foi em seguida, agitada em vórtex por 10 min e armazenado a 4°C ao abrigo da luz.

Para os ensaios com as células em microdispositivo, a solução estoque foi diluída em meio RPMI (DOX=0,025 mg. mL<sup>-1</sup> e PXT =0,015 mg. mL<sup>-1</sup>) concentrações máximas de cada um dos fármacos) e armazenada em frasco de vidro âmbar a 4°C ao abrigo da luz.

### **Cultivos e análises celulares**

#### **3.2.10 Cultivo das células em placas**

As células de câncer de mama (Michigan Cancer Fundation, MCF-7) foram cultivadas em meio Roswell Park Memorial Institute, (RPMI), suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) e 1% de antibiótico (estreptomicina). O cultivo foi realizado em garrafas para cultura de células (72 cm<sup>2</sup>), até atingirem a confluência (área ocupada pelas células na garrafa ou placa de cultivo) de 80%. A seguir, as células foram retiradas da garrafa para cultivo celular, adicionando-se 3 mL tripsina EDTA e incubadas por 30 segundos. A ação da tripsina EDTA foi neutralizada adicionando-se 3 mL de meio RPMI e, então, as células foram separadas por centrifugação por 5 minutos a 1500 rpm.

Após a centrifugação, as células sedimentam, o que é observado como a formação de um pellet no fundo do frasco. O sobrenadante contendo a tripsina EDTA e RPMI é removido, e as células são resuspendidas novamente, agora em 1 mL de meio RPMI. Uma alíquota desta solução contendo meio e células é retirada (20 µL) e é diluída em 20 µL de solução de azul de Tripán 0,4% (marcador). As células marcadas com azul de Tripán foram contadas em câmaras de Neubauer e após a contagem do número de células, foi

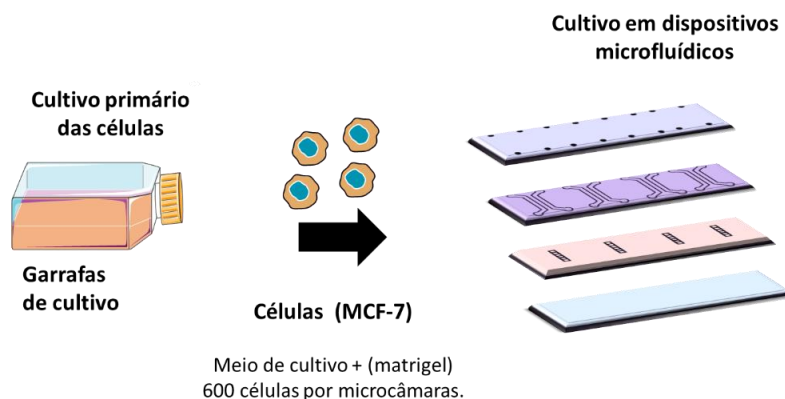
calculado o volume necessário para obter um número de célula considerado o ideal para inocular nas câmaras de cultivo e nos poços das placas (60.000 células).

Por fim, as células utilizadas para a contagem foram novamente resuspendidas em uma solução contendo 320 µL de meio de cultivo e 80 µL de Matrigel® (matriz extracelular composta principalmente por: fatores de crescimento, heparina, colágeno tipo IV e laminina). As soluções foram adicionadas a placas de 24 poços (60.000 células por poço) e incubadas a 37 ° C em atmosfera controlada contendo 5% de CO<sub>2</sub> e umidade controlada por 96 h.

#### 3.2.11 Cultivo das células no microdispositivo reversível

O cultivo em microdispositivo foi realizado da mesma forma que no item 3.2.10. No entanto, foi definida uma concentração de 60.000 células, para todo o microdispositivo (para os 24 poços-cerca de 600 células por câmara de cultivo em 4 mm<sup>2</sup> área total de cada câmara). Esse número de células foi baseado em análises anteriores, escolhendo um número de células (em proporção) que permitisse a comparação do cultivo em microfluídica com o cultivo em placas. De forma que as câmaras de cultivo não tivessem um número muito elevado de células e fosse possível efetuar a contagem celular ao longo do tempo.

As células foram resuspendidas em uma solução contendo 320 µL de meio RPMI e 80 µL de Matrigel® (o dobro do volume utilizado em placas). Foram inoculados 4 µL da solução contendo as células em cada uma das câmaras de cultivo (nos 4 módulos do microdispositivo-total de 24 câmaras de cultivo inoculadas- 6 câmaras por módulo). O dispositivo foi colocado em incubadora (a 37 ° C ,5% de CO<sub>2</sub> e umidade controlada) por 30 minutos para a polimerização da matriz e, após este intervalo de tempo, o microdispositivo foi preenchido com meio RPMI. As células foram incubadas por 72h, ocorrendo a contagem e a troca de meio a cada 24h (Figura 25).



**Figura 25:** Esquema do cultivo celular em microdispositivo. Primeiramente as células são cultivadas em garrafas próprias para culturas de células, onde após atingir 80% de confluência (80% da área da garrafa), são retiradas com auxílio de tripsina, centrifugadas, contadas em câmara de Neubauer e então, resuspendidas e inoculadas manualmente com auxílio de micropipeta nas microcâmaras de cultivo. Após, o microdispositivo é totalmente vedado e preenchido os canais com meio de cultivo. Todo o processo de inoculação é realizado em fluxo laminar estéril. O microdispositivo então é incubado a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> e umidade controlada.

Vale ressaltar que, no Capítulo 5, o cultivo em microdispositivo foi realizado da mesma forma. No entanto, foi definido o número de 40.500 células, para todo o microdispositivo (cerca de 450 células por câmara de cultivo). Para isso, as células foram contadas em câmara de Neubauer e resuspendidas em uma solução contendo 280 µL de meio RPMI, 60 µL de Matrigel® e 60 µL de agarose 1% (w/v), denominada solução de inoculação.

### 3.2.12 Formação dos esferoides

As células foram cultivadas previamente em garrafas de cultura, até atingirem 80% de confluência. Após esse período, elas foram tripsinizadas e resuspendidas em 1 mL de meio RPMI.

Para a formação dos esferoides, foi utilizada a técnica de agregação forçada por superfície não aderente. Para formação dos esferoides foram utilizadas 60 mil células em 340 µL de meio e 170 µL de Matrigel®, onde foi colocada uma alíquota de 55 µL em cada poço. Nesse experimento, foi utilizado uma placa de vidro, com 8 poços devidamente tratados, em formato de *chambers* (LabTeck II –Slide System 8 well). A placa foi

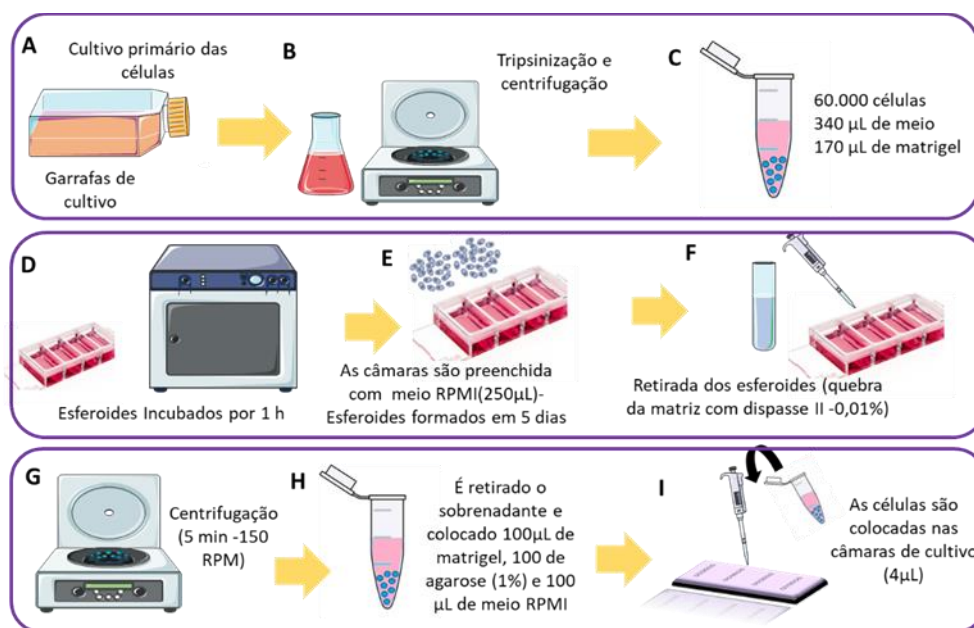
colocada em incubadora com umidade controlada e com 5% CO<sub>2</sub> durante 60 min para a polimerização do gel. Depois desse tempo, foi adicionado em cada poço 250 µL de meio de cultivo (RPMI) e a placa foi novamente levada para incubadora por 1 semana e o meio foi trocado a cada 48h.

### 3.2.13 Cultivo dos esferoides em microdispositivo

Após dos esferoides atingirem o tamanho de aproximadamente de 100 µm, os mesmos foram retirados das placas e inoculados nos microdispositivos. Para isso, foi primeiramente efetuada a quebra da matriz polimérica, no qual os esferoides estavam presos (Matrigel®). Foi utilizado uma solução de 1% da enzima Dispase II, e adicionado em cada um dos 8 poços, 100µL da solução. A placa contendo os esferoides foi levada para a incubadora a 37°C por 60 min.

Atingindo o tempo de 60 min, os esferoides foram retirados da incubadora, e para neutralizar a ação da Dispase II, adicionado em cada poço 100µL uma solução de DPBS e 1 % de SFB. A mistura contendo os esferoides, DPSB e SFB e Dispase II, foi colocada cuidadosamente me um tubo modelo falcon de 20mL e centrifugado por 5 min e 1500 RPM. O sobrenadante foi retirado de forma que não fosse retirado os esferoides, os mesmos foram resuspendidos em uma mistura de 60µL de meio de cultivo RPMI e 20 µL de uma solução contendo Matrigel® e 1% agarose.

Em seguida, para a adição dos esferoides nas câmaras de cultivo do microdispositivo, efetuou-se a adição manual. Para isso, para cada uma das 6 câmaras de cultivo, referentes a um dos módulos do microchip (Figura 26), foi adicionado 2µL da solução contendo esferoides.



**Figura 26:** Formação dos esferoides. (A) Cultivo das células de MCF-7 em placas, até atingir a confluência de 80%; (B) As células são tripsinizadas e centrifugadas, retirando o sobrenadante; (C) Uma alíquota contendo 60.000 células foi resuspensa em 340µL de meio RPMI +170 µL de Matrigel®; (D) São adicionadas 55 µL da solução contendo células +matriz em placas de vidro, em forma de gotas e incubadas a 37°C por 1h, para polimerizar a matriz;(E) Após a polimerização da matriz, foram adicionados 250 µL de meio RPMI e incubado por 24h,o meio foi trocado cada 24h;(F) após a formação dos esferoides (~5 dias), é realizada a quebra da matriz, utilizando a enzima Dispase II(0,01%- 100 µL) por 30 min, a 37°C; (G) Para neutralizar a ação a enzima após 30 min, foi adicionado 100 µL de uma solução contendo DPS +Soro feral bovino (1%) e centrifugado os esferoides por 5 min a 150 RPM; (H) Após a centrifugação, foi retirado o sobrenadante e os esferoides foram resuspensos cuidadosamente em um solução contendo 100 µL de Matrigel® + 100 µL de agarose (1%) + 100 µL de meio RPMI; (I) Foi adicionado 4 µL da solução contendo os esferoides em cada uma das câmaras de cultivo, o microdispositivo foi totalmente vedado e levado a incubadora por 60 min a 37°C, após esse período, foi bombeado 4 µL de meio RPMI de cultivo para cada uma das microcâmaras e incubado novamente o microdispositivo, por 5 dias e o meio foi trocado a cada 24 h.

Primeiramente as câmaras de cultivo contendo as células foram refrigeradas a 4°C por 30 minutos para solidificar a agarose e em seguida as mesmas foram levadas em incubadora por 30 min para solidificar a Matrigel®. Após esse período o microdispositivo foi preenchido com meio RPMI e levado novamente em incubadora com umidade controlada e com 5% CO<sub>2</sub> e o meio trocado a cada 24 h. Para não ocorrer evaporação do meio de cultivo, juntamente com o microdispositivo, foi incubado uma placa contendo PBS, para manter a umidade e diminuir a evaporação do meio nas microcâmaras.

### 3.2.14 Caracterização dos esferoides

A caracterização morfológica dos esferoides foi realizada inicialmente avaliando o tamanho, a integridade do núcleo e membrana e a forma. Para isso, foi utilizada a técnica de microscopia confocal invertida de fluorescência (Zeiss LSM780-NLO; Carl Zeiss AG, Oberkochen, Germany). As células foram marcadas utilizando os marcadores DAPI marcador fluorescente nuclear e faloídina marcador fluorescente de membrana celular.

Para avaliar a uniformidade dos agregados celulares, foi calculado o índice de esfericidade (IE) em relação a circularidade (CIR) dos agregados celulares (em uma distribuição normal), utilizando as Equações (2) e (3):

$$CIR = \left( \frac{4\pi \times \text{Área}}{\text{Perímetro}^2} \right) \quad (2)$$

Onde:

CIR é a circularidade dos agregados;

Área: área dos agregados celulares,

Perímetro: perímetro dos agregados celulares.

$$IE = \sqrt{CIR} \quad (3)$$

Onde:

IE: É o índice de esfericidade de acordo com a circularidade dos esferoides.

Para que os agregados sejam considerados esferoides, o IE deve ser maior de 0,8.

### 3.2.15 Crescimento e viabilidade celular

Para estimar o crescimento e a viabilidade celular, foi utilizado o marcador de viabilidade *Live and Dead*, um marcador fluorescente, que discrimina as células viáveis (em verde) de não viáveis (em vermelho). As células cultivadas em placas de poços e nas câmaras de cultivo e foram incubadas por 12 h. Em seguida, foram lavadas 2 vezes com PBS. Após as lavagens, o marcador foi adicionado manualmente (2 µl do marcador nas câmaras de cultivo) e 200 µl do marcador nos poços. As células foram incubadas por 15 minutos, sendo o excesso de corante retirado com PBS 1X.

As células foram observadas em microscopia de fluorescência, que permitiu obter imagens e contabilizar as células viáveis (em verde) e não viáveis (em vermelho) para cada tempo determinado. Para verificar a porcentagem de células viáveis ao longo do tempo, foi aplicada a Equação 4:

$$\text{Células viáveis} = \frac{\text{Total de células viáveis}}{\text{Total de células contadas inicialmente}} \times 100\% \quad (4)$$

### 3.2.16 Viabilidade dos esferoides

A avaliação da viabilidade celular (apenas as áreas em verde nos esferoides), foi utilizado novamente o marcador *Live and Dead*. Os esferoides foram cultivados em placas de poços e no microdispositivo e para cada técnica de cultivo, foi comparada a viabilidade.

Primeiramente, para ambos os cultivos, foi retirado o meio de cultivo (poços e microcâmaras) e efetuadas duas lavagens com auxílio de micropipetas (5 min cada lavagem) com PBS.

Viabilidade em placas (controle): Foi adicionado 200 µL do marcador, e as células foram incubadas por 30 min a 37°C. Após esse período foi retirado o excesso de marcador com PBS e adicionado 250µL de meio RPMI em cada poço. As células foram novamente incubadas a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>.

Viabilidade em microdispositivo. Foi escoado com auxílio de bombas seringas 4 µL do marcador em cada uma das microcâmaras e incubado por 30 min a 37°C. Após, assim como os esferoides em placas, as microcâmaras foram lavadas com PBS para retirada do excesso do marcador e adicionado 4µL de meio RPMI em cada microcâmara. As células foram novamente incubadas a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>.

Para estimar da viabilidade dos esferoides, os mesmos foram observados em microscopia de fluorescência (Zeiss Axio - Oberkochen, Germany), onde foram utilizados filtros PI (excitação em 494 nm e emissão em 517 nm) para fluorescência verde e o filtro Texas red (excitação em 528 nm e emissão em 617 nm para fluorescência vermelha. Foram obtidas imagens dos esferoides em diferentes tempos e essas imagens foram tratadas e calculada a viabilidade (diminuição das áreas em verde) utilizando uma rotina de MATLAB. Os esferoides, sem a presença dos fármacos foram acompanhados

por 7 dias (168 h), três imagens a cada 24 h de cada poço. Os esferoides tratados com os fármacos, foram obtidas imagens (em triplicata) de cada poço a cada 30 min.

Além da análise utilizando o marcador *Live and Dead*, também foi verificado o perímetro dos esferoides, por meio das imagens obtidas em microscopia. Para essa análise foi utilizado o software Image J e assim, estipulado o perímetro médio dos esferoides.

### 3.2.17 Análise morfológica do efeito do fármaco sobre as células

As morfologias tanto das células tratadas com DOX (0,025 mg. mL<sup>-1</sup>) quanto das células sem tratamento (controle) foram verificadas utilizando-se a técnica de microscopia eletrônica de varredura com alto vácuo (FEI Quanta 650 FEG- voltagem 10 kV e distância de trabalho (WD) de 6 mm, FEI Company, Hillsboro, OR, USA). As células foram tratadas de acordo com o protocolo de Wang et al.(2016): primeiramente, elas foram fixadas às câmaras de cultivo utilizando glutaraldeído 2% e paraformolaldeído. 4%, e passaram por um processo de desidratação química utilizando diferentes concentrações de etanol (50,70,95 e 100%) (WANG; TIAN; AN, 2016). Em seguida, o microdispositivo foi desmontado, e a base das câmaras de cultivo (vidro) foi cortada, utilizando-se para isso um cortador com ponta, de modo a facilitar o encaixe das células ao porta-amostra. Finalmente, realizou-se o tratamento convencional de preparo de amostras para avaliação em MEV, recobrimo-se as células por uma fina camada de ouro com um Sputter Coater Bal-Tec SCD (Baltec-Jundiaí, SP-Brasil).

### 3.2.18 Avaliação teórica do efeito combinado

O efeito combinado foi estimado pela técnica de curva de resposta para cada concentração testada (análise isobolográfica). Essa técnica é bastante empregada para relacionar a dose responsiva, em relação de sinergismo, aditivo e/ou antagonismo entre dois fármacos. Nesse caso, para calcular o efeito sinérgico, utilizou-se o software livre SynergyFinder 2.0 (IANEVSKI; GIRI; AITTOKALLIO, 2020). (<https://synergyfinder.fimm.fi/synergy/2020113015450556685/>). As informações de IC<sub>50</sub> (concentração inibitória para diminuir a viabilidade celular a 50%) dos fármacos de forma individuais são necessárias (HUANG et al., 2019).

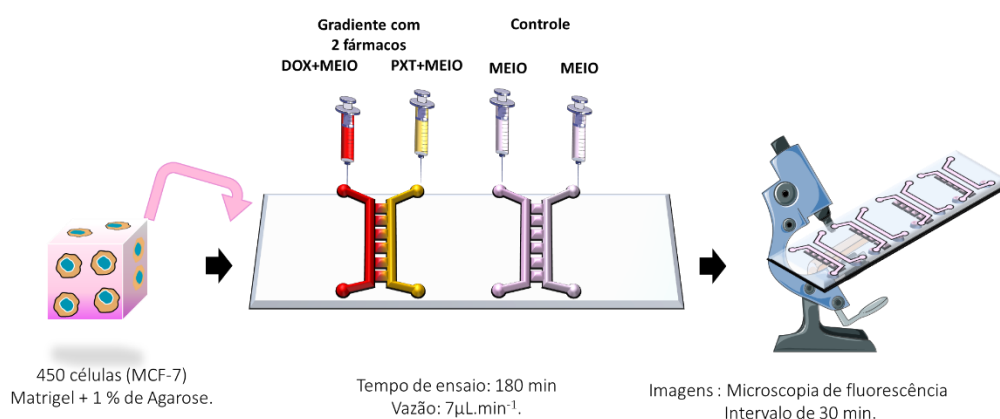
Com esses dados, foi possível, sob o ponto de vista teórico, predizer possíveis concentrações de cada um dos fármacos, ou seja, o Índice de combinação (IC) para obter

o efeito sinérgico. Os índices de combinação menores que 1, representam efeitos sinérgico, iguais a 1, efeitos aditivos (os fármacos não interagem) e acima de 1, efeitos antagônicos (os fármacos se anulam ou tem efeitos adversos).

### 3.2.19 Avaliação experimental do efeito combinado em células

Para analisar o comportamento das células na presença de DOX e PXT simultaneamente em diferentes combinações de concentrações, foram utilizadas células MCF-7. O ensaio foi realizado conforme descrito no item 2.2.4, onde foram testadas 3 diferentes concentrações de entrada de cada fármaco (DOX=0,010 mg e PXT=0,002; DOX= 0,010 e PXT=0,004; DOX=0,011 e PXT=0,004)

As soluções de DOX e PXT nas concentrações mencionadas foram introduzidas em entradas distintas para cada fármaco no microdispositivo (Figura 31).

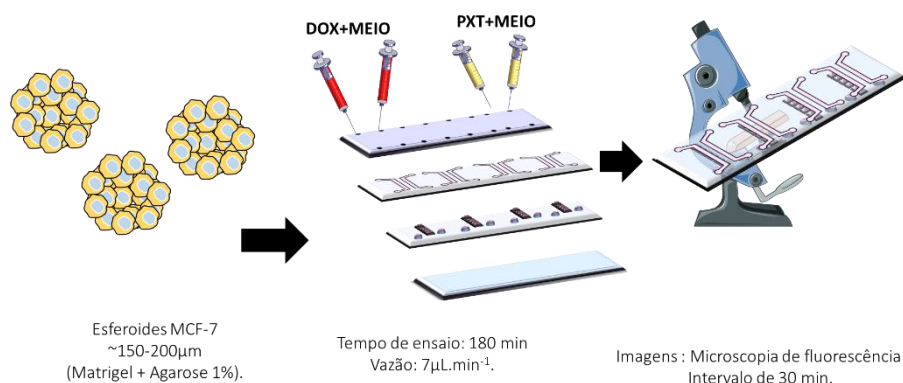


**Figura 27:** Diagrama ilustrativo do ensaio da geração do gradiente difusivo com dois fármacos simultâneos. As células foram inoculadas manualmente (450 células por câmara), com Matrigel® + agarose. Após a polimerização da matriz, foi bombeado em uma das entradas o fármaco DOX e na outra PXT por 3h., juntamente ao ensaio foi realizado o controle, utilizando a mesma quantidade de células, onde foi bombeado apenas meio de cultivo (RPMI) por 3h. Durante todo o ensaio, foram obtidas imagens das microcâmaras de cultivo no intervalo de 30 min.

Os gradientes de concentração foram estabilizados em 45 min e em seguida, manteve-se o gradiente de concentração com os dois fármacos sob escoamento constante das soluções por 180 min com auxílio de bombas-seringas. O comportamento celular nas câmaras de cultivo foi observado utilizando microscopia de fluorescência automatizada (imagens coletadas a cada 30 min).

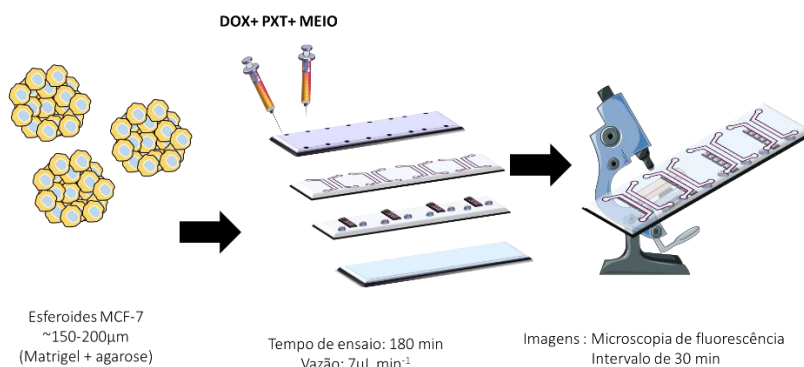
### 3.2.20 Comportamento esferoides na presença de fármaco

Para avaliar o comportamento dos esferoides na presença dos fármacos (DOX e PXT), não foi utilizado o gradiente de concentração difusivo. Isso deve-se ao fato de os esferoides possuírem áreas/ tamanhos maiores que as subáreas presentes virtuais nas câmaras de cultivo. Primeiramente, os esferoides foram marcados com o marcador fluorescente *Live and Dead* e após, foram escoados em cada entrada a concentração de  $0,1 \text{ mg. mL}^{-1}$  de DOX e  $0,1 \text{ mg. mL}^{-1}$  de PXT. Vale ressaltar, que os fármacos foram diluídos em meio RPMI. As soluções foram escoadas durante 180 min com auxílio de bombas-seringas (Figura 28).



**Figura 28:** Diagrama ilustrativo do ensaio da ação dos s fármacos em esferoides. Os esferoides após de formados, foram inoculados manualmente, com Matrigel® +agarose nas câmaras de cultivo. Após a polimerização da matriz, foi bombeado nas duas entradas o fármaco DOX em um dos módulos e nas entradas do outro módulo PXT por 3h. Vale ressaltar que para o ensaio com os ambos fármacos, não houve a geração do gradiente difusivo de concentração. Durante todo o ensaio, foram obtidas imagens das câmaras de cultivo no intervalo de 30 min.

A análise do efeito combinado, foi realizada em dois ensaios, onde foram testadas as concentrações de  $0,05 \text{ mg. mL}^{-1}$  de DOX e  $0,025 \text{ mg. mL}^{-1}$  de PXT no primeiro ensaio, e no segundo ensaio  $0,070 \text{ mg. mL}^{-1}$  de DOX e  $0,025 \text{ mg. mL}^{-1}$  de PXT (Figura 29). O comportamento dos esferoides para todos os ensaios foi observado utilizando microscopia automatizada de fluorescência (imagens coletadas a cada 30 min).



**Figura 29:** Diagrama ilustrativo do ensaio da ação dos fármacos combinados em esferoides. Os esferoides após de formados, foram inoculados manualmente, com Matrigel® + agarose nas câmaras de cultivo. Após a polimerização da matriz, foi bombeado nas duas entradas os fármacos DOX e PXT, previamente misturados na mesma seringa. O ensaio foi realizado por 3h. Vale ressaltar que para o ensaio com os ambos fármacos, não houve a geração do gradiente difusivo de concentração. Durante todo o ensaio, foram obtidas imagens das câmaras de cultivo no intervalo de 30 min

As imagens obtidas foram tratadas e analisadas utilizando uma rotina de MATLAB, avaliando os tamanhos dos esferoides e o número de pixel correspondente a área em verde nos esferoides.

### 3.2.21 Caracterização da morte celular (AnexinaV/PI)

Para avaliar o mecanismo de morte celular, após o tratamento das células com os fármacos, foi realizado o ensaio de apoptose/ necrose. Para isso, foram utilizados os marcadores AnexinaV/PI. O kit AnexinaV-FITC usa Anexina V conjugada com fluoresceína isotiocianato (FITC) para marcar locais de fosfatidilserina (PS) na superfície da membrana. O iodeto de propídio (PI) marca o DNA celular em células necróticas, onde a membrana celular foi totalmente comprometida. Esta combinação permite diferenciar células apoptóticas precoces (fluorescência verde), células necróticas (fluorescência vermelha) e células viáveis (sem fluorescência) (RIEGER et al., 2011).

Após os ensaios com os fármacos, as câmaras de cultivo contendo as células, foram lavadas com PBS, utilizando bomba seringa, e foi adicionado 2µL de uma solução de ligação (ANEXO I) em cada uma das microcâmaras por 15 min em temperatura ambiente. Após, foi adicionado 2µL dos marcadores AnexinaV/PI, e as células foram incubadas por 15 min a 37 °C. Após as células foram fixadas em gelo, utilizando uma

solução de paraformolaldeído 1%(m/v) por 10 min e foram observadas em microscopia de fluorescência.

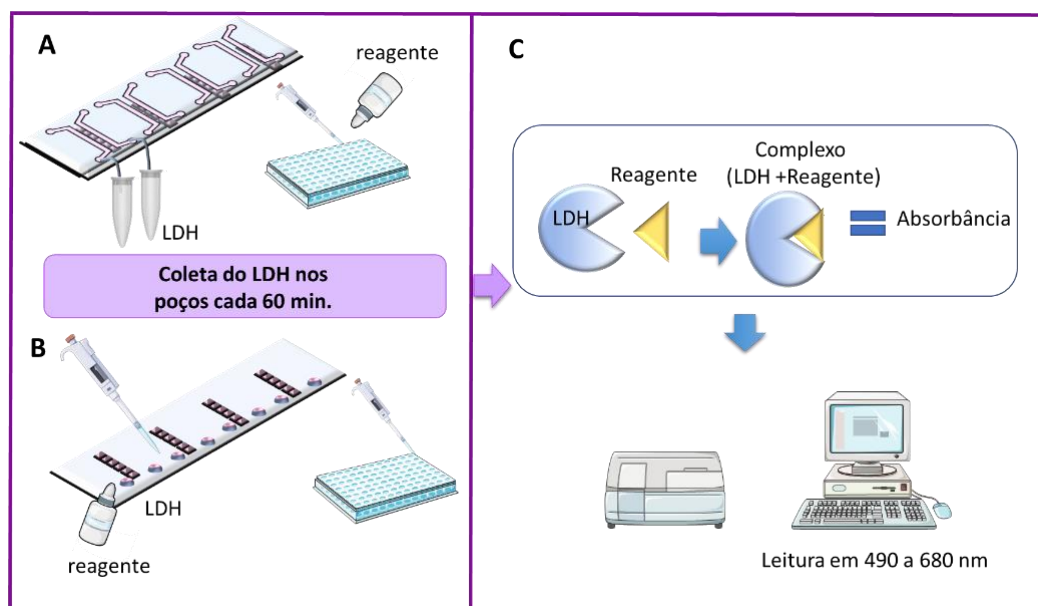
### 3.2.22 Análise do efeito do fármaco nas células (LDH)

Com o intuito de analisar o efeito do fármaco sobre as células tumorais, foi realizado o ensaio de lactato desidrogenase (LDH). A lactato desidrogenase é uma enzima responsável por transformar o piruvato presente nas células em lactato. A sua presença em excesso no citosol acidifica o meio intracelular, propiciando a proliferação das células tumorais (BRISSON et al., 2016) medida que o fármaco entra nas células, as membranas das células tumorais são rompidas, ocorrendo a liberação do LDH para o meio de cultivo. A quantidade de LDH no meio de cultivo será proporcional ao número de células não viáveis. Para a realização desse teste, foi utilizado o kit Pierce LDH Cytotoxicity Assay.

Análise convencional de coleta de LDH (por mangueiras): Apenas o meio de cultivo (contendo os fármacos testados e possíveis resíduos células mortas) da saída dos dispositivos (cerca de 50 µL) foi coletado, e a seguir foi adicionado em placas de 96 poços 50 µL do reagente. Na presença da enzima o reagente é processado, ou seja, sofre mudança de cor. A placa foi incubada à temperatura de 37 °C por 30 min, e após este intervalo, foi realizada a avaliação em leitor de placa (Asys, Expert Plus, Cambridge, CA, UK), na faixa de 490 a 680 nm.

Análise no microdispositivo (poços): Neste ensaio, o sobrenadante resultantes dos ensaios foram coletados pelos poços (Figura 30), para cada poço foi adicionado 2 µL do reagente enzimático, como o microdispositivo está sendo mantido a 37°C durante os ensaios, não é necessário levar o microdispositivo a incubadora, a reação ocorre em tempo real, à medida que as células liberam lactato, a enzima reage com o reagente enzimático em tempo real. As amostras foram retiradas com auxílio de micropipetas a cada 60 min.

Após 180 min de experimento, as absorbâncias de ambas as amostras (coletas em tubos e nos poços) foram analisadas em leitor de placas (Asys, Expert Plus, Cambridge, CA, UK), na faixa de 490 a 680 nm. Dessa forma foi possível determinar a concentração de lactato liberado ao longo de 180 min.



**Figura 30:**Diagrama esquemático da diferença dos dois métodos de coleta. (A) A coleta é realizada por meio de mangueiras acopladas nas saídas dos canais e tubos plásticos (*ependorfs*). As enzimas são coletadas em intervalo de 60 min e adicionadas em placas de 96, ao final do processo (180 min), é adicionado o reagente nos poços juntamente com a enzima e levado ao leitor de placas para ler a absorbância das amostras. (B) Na nova técnica empregada, o reagente é adicionado aos poços, permitindo que à medida que a célula libere lactato, já ocorra a reação dentro dos poços. Os poços são esvaziados a cada 60 min e ao final do processo, é efetuada a leitura da absorbância e leitor de placas. (C) Diagrama da reação da enzima lactato desidrogenase com o reagente. Quanto maior a liberação de lactato, maior será o valor de absorbância. A leitura de absorbância é realizada em leitor de placa na faixa de 490-680 nm.

#### Metabolismo celular-Consumo de glicose presente no meio

O crescimento celular, foi avaliado indiretamente por meio da quantificação da concentração de glicose presente no meio de cultivo. Para essa análise, o meio não foi trocado a cada 24 h, nesse caso, apenas foi adicionado meio fresco a cada 24h, para evitar a falta de suplementos de nutrientes. Antes da adição do meio fresco, foram retiradas (com auxílio de micropipetas) amostras do meio de cultivo presente nas placas e do microdispositivo. As retiradas das amostras eram realizadas a cada 24h.

Para essa análise foi utilizado o kit Glucose God-Pap, Liquid Stable, um reagente enzimático colorimétrico que aponta a presença de glicose no meio, por meio da mudança de tonalidade (incolor para rosa). Para efetuar a leitura foi adicionado 10µL de meio contendo moléculas de glicose em 1 mL de reagente a 37°C. As amostras foram homogeneizadas e retirada uma alíquota de 100 µL para efetuar a leitura da absorbância

em leitor de placas (Asys, Expert Plus, Cambridge, CA, UK), na faixa de 492 a 520 nm. Os resultados obtidos foram somados com os resultados anteriores para obter o valor absoluto de glicose consumida ao longo do tempo.

Para os ensaios com os fármacos, após cada 30 minutos (tempo de cada medida) de ensaio, era interrompido a suplementação com o fármaco e preenchida as câmaras de cultivo com meio de cultivo. Ao fim do experimento (180 min), o microdispositivo foi incubado a 37°C por 24h. Após 24h, foi retirada uma alíquota das câmaras de cultivo referente a cada tempo de tratamento com os fármacos (*e.g.* 30,60...180 min).

### **Gradiente difusivo de concentração**

#### **3.2.23 Geração de gradiente de concentração**

Verificação do gradiente de concentração sem células: Primeiramente, foi adicionado manualmente (com auxílio de micropipeta), matriz extracelular-Matrigel®, em todas as câmaras de cultivo. Para validar o gradiente de concentração, a Matrigel® foi mantida a 37° C durante 30 min até a polimerização completa da matriz. Após, foi escoada em uma das entradas uma solução de 0,025 mg. mL<sup>-1</sup> de DOX diluída em RPMI, enquanto na outra entrada foi escoado apenas meio RPMI (sem antibiótico e soro fetal bovino). A escolha da DOX deve-se por ser um fármaco que apresenta fluorescência, facilitando correlacionar a fluorescência com as concentrações geradas (ver curva analítica de DOX -ANEXO II).

Durante todo o experimento, a vazão foi mantida a 7 µL.min<sup>-1</sup>. A escolha dessa vazão, deve-se a que além de favorecer a difusão mássica do fármaco (ISMAGILOV et al., 2000), a mesma não ocasionou danos operacionais ao microdispositivo, como o descolamento das camadas do microdispositivo durante os ensaios. As soluções foram escoadas até o gradiente de concentração estabilizar (45 min).

As imagens das microcâmaras de cultivo foram obtidas por microscopia de fluorescência (Nikon Ti Eclipse, EUA), em intervalos de 10 min. As imagens foram convertidas para escala de cinza e analisadas utilizando o software ImageJ (National Institutes of Health, NIH-USA.20 versões 1.48) para aquisição de dados.

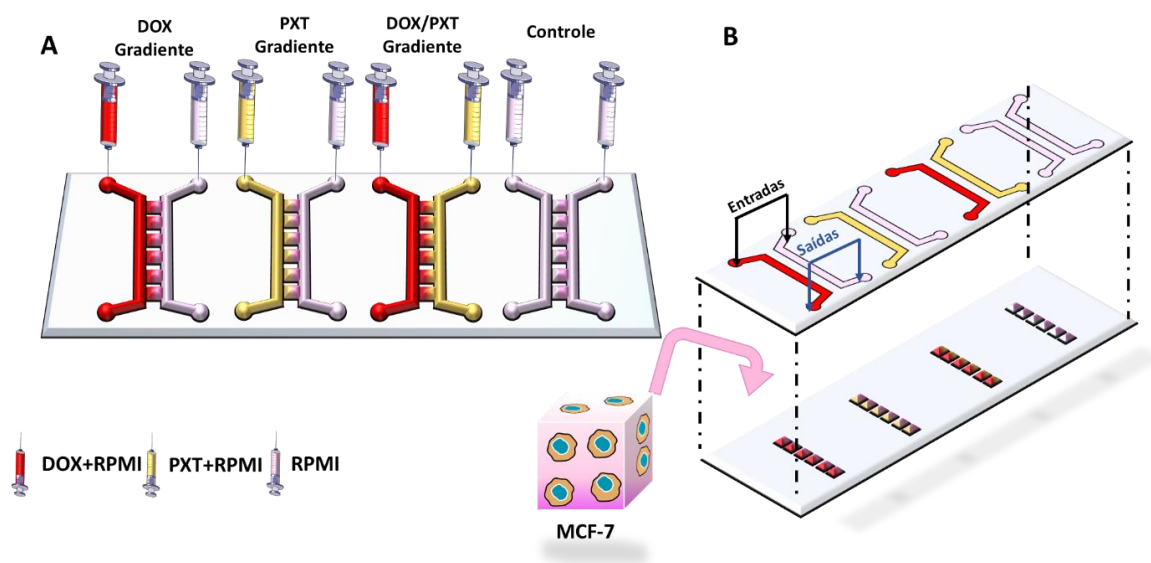
Gradiente de concentração na presença de células (*drug screening*): O comportamento das células na presença de um gradiente de concentração de DOX na microcâmara foi avaliada. Primeiro, as células foram removidas da garrafa de cultura e marcadas com 10  $\mu\text{L}$  com calceína-AM Assay Kit (Abcam, EUA-1: 500), e incubadas a 37°C por 15 min. Em seguida, as células foram lavadas com PBS para remover o excesso de calceína-AM e foram centrifugadas por 5 minutos a 1.500 rpm (CW3-ThermoFisher Scientific - Germany-190 x g).

O sobrenadante contendo um excesso de calceína-AM/PBS foi removido, e as células foram novamente ressuspensas (60.000 células) em 320  $\mu\text{L}$  de meio de cultura e 80  $\mu\text{L}$  de Matrigel®. Dessa solução, 4  $\mu\text{L}$  foram adicionados cada uma das câmaras de cultivo (cerca de 600 células por câmara). O microdispositivo foi totalmente montado e incubado por 4 h a 37°C. Após 4h, as células foram observadas em microscopia de fluorescência para verificar a viabilidade celular (em verde).

Posteriormente, o ensaio foi realizado escoando uma solução de 0,025  $\text{mg.mL}^{-1}$  de DOX diluída em RPMI em uma das entradas, e na outra entrada apenas o meio RPMI sem antibiótico e soro fetal bovino. As soluções foram escoadas primeiramente por 45 minutos para estabilizar o gradiente de concentração de DOX e após, por mais 3h.

Gradiente de concentração de dois fármacos simultâneos: Para gerar o gradiente de concentração utilizando dois fármacos simultaneamente foi primeiramente definido a melhor concentração de entrada de cada um dos fármacos, levando em consideração a análise isobolográfica, que serve para definir as possíveis combinações de fármacos para obter o efeito. Após estabelecer as concentrações de entrada de cada um dos fármacos (DOX e PXT), foi escoado em uma das entradas DOX e na outra entrada PXT.

Ambos os fármacos foram diluídos em meio RPMI. Em seguida, foram obtidas imagens em microscopia de fluorescência (Zeiss Axio- Oberkochen, Germany) do interior das câmaras de cultivo. As vazões para cada uma das entradas foram mantidas constantes e iguais a 7  $\mu\text{L.min}^{-1}$ . A Figura 31, apresenta um diagrama esquemático do ensaio da geração do gradiente com um dos fármacos, com dois fármacos e o controle (apenas meio de cultivo).



**Figura 31:** Diagrama esquemático operacional do microdispositivo, o microdispositivo possui 4 módulos que permite realizar 4 ensaios em diferentes condições, gerando um gradiente difusivo de concentração (câmaras de cultivo em cada condição experimental - sextuplicatas). (A) Condições experimentais investigadas, onde em um dos módulos foi testado o fármaco individualmente, após dois fármacos (um em cada entrada) e o controle, de forma simultânea. (B) Esquema da ilustrativo demonstrando as partes do microdispositivo responsável pela geração do gradiente. O microdispositivo possui 6 câmaras de cultivo por módulo, onde as células são inoculadas e para cada módulo dois canais, responsáveis por suprir as microcâmaras com meio e/ou fármacos. Cada conjunto de canais possuem duas entradas e duas saídas. Para todo o experimento foi utilizada uma vazão de  $7 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ , a  $37^\circ\text{C}$ .

A escolha do tempo de 3h, foi devido ao tempo que o quimioterápico é aplicado nos pacientes durante tratamento. A ideia foi observar o comportamento celular durante a infusão do fármaco em tempo real.

O comportamento celular foi observado em microscopia de fluorescência automatizada, sob controle de temperatura e  $\text{CO}_2$ . As imagens foram obtidas em intervalos de 30 min. As células consideradas viáveis, emitiram fluorescência verde quando excitadas a 485 nm e foram analisadas usando ImageJ e software MATLAB.

## **Análise de imagens**

### **3.2.24 Análise de Imagens**

Primeiramente, as imagens foram obtidas em microscopia de fluorescência automatizada. (NLO-LSM780, Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) por 180 min. Para esse ensaio, um filtro de contraste de fase foi usado para este ensaio, que identificou células viáveis, pela fluorescência emitida pela membrana celular. As imagens passaram por um pré tratamento utilizando o software Image J, que converteu as imagens para escala de cinza. Em seguida, cada uma das câmaras de cultivo foi subdividida em 36 regiões de tamanhos iguais e, cada uma dessas regiões foram analisadas individualmente.

A contagem de células viáveis, foi realizada automaticamente, utilizando como ferramenta uma rotina de MATLAB. Foi estabelecido um limite de pixel (acima de 100), para identificar as células viáveis. Esse limite foi estabelecido com base na análise visual anterior para identificar as células viáveis. As imagens foram filtradas, para selecionar apenas as células com valor de intensidade acima de 100. Este valor foi obtido por calibração e correspondeu à intensidade média de células viáveis. Por fim, foi removido das imagens as bordas das câmaras de cultivo para evitar qualquer perturbação na contagem. O mesmo procedimento foi estabelecido para células marcadas (com fluorescência), nesse caso o limite de pixel foi alterado de acordo com a emissão de fluorescência correspondente a tonalidade verde. Vale ressaltar que, rotina do MATLAB foi validada também por contagem manual (ANEXO II).

### **3.2.25 Análise de Imagens para esferoides**

Para quantificar a viabilidade dos esferoides ao longo do tempo, foi novamente utilizada uma rotina em MATLAB. Nesse caso, os esferoides foram marcados com marcadores fluorescentes (verde para células viáveis e vermelhos para células não viáveis), o programa identifica a área com pixel que corresponde a tonalidade verde, assim como o pixel relativo à tonalidade vermelha, contabilizando esses pixels. Porém, como os esferoides possuem muitas células agregadas, é difícil quantificar isoladamente as células viáveis. Por isso, foi estipulado a viabilidade pela diminuição apenas da área em verde dos esferoides (em pixel), que representa apenas a área ocupada pelas as células viáveis presentes nos esferoides. A viabilidade foi realizada ao longo de cada tempo (t).

A área considerada viáveis dos esferoides foi normalizada, dividindo a área remanescente em verde, pela área inicial em verde, isso para cada tempo observado, conforme a Equação 5:

$$VE = \frac{A}{A_0} \quad (5)$$

Onde:

VE: A viabilidade do esferoide (%)

A: São apenas as áreas em verde dos esferoides no tempo= t

A<sub>0</sub>: São apenas as áreas iniciais (em verde) dos esferoides em verde no tempo= 0

### **Análise estatística e repetibilidade dos dados**

#### **3.2.26 Análise estatística dos dados.**

Os resultados apresentados nessa tese, foram analisados estatisticamente utilizando ANOVA de uma via com um intervalo de confiança de 95% (p<0,05) para verificar se há diferenças entre as amostras foi utilizado o teste Tukey, que verifica (caso haja diferenças) se as diferenças entre as amostras são estatisticamente significativas. Para todas as análises foi utilizado o software Origin Pro versão 2019b, a função Statistic,

#### **3.2.27 Repetibilidade dos dados obtidos**

Para verificar se os dados obtidos são reproduzíveis, além da análise estatística realizada, todos os experimentos foram realizados em triplicatas. As análises celulares, tanto em placas como em microdispositivo foram repetidas pelo menos 3 vezes e em triplicatas.

Para verificar se o processo de construção de microdispositivo é reproduzível, foi analisado as geometrias de 4 microdispositivos, comparando as dimensões dos canais e das câmaras de cultivo entre os módulos e entre os microdispositivos testados (ANEXO II). Além disso, para os ensaios de *screening* de fármacos e cultivo celular, foram utilizados ao longo do projeto 4 microdispositivos, sendo pelo menos dois microdispositivos utilizados simultaneamente. Essa metodologia foi adotada ao longo de todos os capítulos

---

## Capítulo 4- Microdispositivo reversível e modular para *screening* de fármacos<sup>1</sup>

---

### Resumo

Este trabalho teve por objetivo o desenvolvimento de um microdispositivo modular e reversível com a capacidade de gerar gradiente de concentração para a triagem de fármacos. Como prova de conceito, foi utilizada a célula de câncer de mama MCF-7 (Michigan Cancer Fundation 7). As células foram expostas a um gradiente de fármaco (doxorubicina) por 180 min com as concentrações variando de 0,011 a 0,025 mg.mL<sup>-1</sup>. As células foram monitoradas utilizando microscopia de fluorescência e obtidas imagens a cada 30 min. As imagens obtidas foram tratadas com o software ImageJ, e o número de células foi avaliado por uma rotina em MATLAB. Por meio da análise de viabilidade foi possível estimar as células viáveis e não viáveis para cada concentração, possibilitando obter a concentração inibitória após 180 min (IC<sub>50</sub>=0,022 mg. mL<sup>-1</sup>). O material utilizado para a fabricação do microdispositivo, também foi caracterizado fisicoquimicamente. Os resultados mostram a eficácia do gradiente de concentração gerado dentro do microdispositivo, sendo observada a redução da viabilidade celular com o aumento da concentração da doxorubicina. O microdispositivo possibilita analisar o comportamento celular de forma dinâmica, reduzindo o tempo de análise e de custo.

**Palavras-chaves:** Microfluídica, *drug screening*, selagem reversível, cultivo celular

---

<sup>1</sup> Capítulo 4 compreende ao artigo publicado na Analytica Chimica Acta (2021).  
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2021.339068>

## 4.1 Introdução

O processo para descoberta de novos fármacos, de uma forma e geral, é caro e exaustivo. Envolve várias etapas até a comercialização final, resultando em um custo global anual estimado em 2,5 bilhões de dólares (LIU; LI; LAM, 2017; BEN-YAKAR, 2019).

Durante o processo de desenvolvimento de medicamentos, uma etapa importante são os ensaios pré-clínicos envolvendo ensaios em celulares tanto *in vitro*, quanto *in vivo* (em animais). Os testes pré-clínicos permitem a obtenção de informações sobre: biodistribuição, ação no metabolismo, excreção e toxicidade do medicamento, antes de testes em humanos (SUN et al., 2017a; SHI et al., 2020). Por outro lado, os testes *in vitro* realizados em placas convencionais possuem desvantagens, uma vez que não mimetizam de forma fidedigna ambientes similares aos ambientes *in vivos*. Além disso, os ensaios animais são demorados e apresentam alto custo. Vale ressaltar que mais da metade de todos os novos medicamentos, falham nas fases II e III dos ensaios clínicos, não obtendo o desempenho esperado (LANGHANS, 2018; SUN; WARDEN; DING, 2019).

A fim de minimizar custos e aumentar a acurácia em ensaios pré-clínicos, é vital eliminar os medicamentos não promissores o mais cedo possível, evitando gastos desnecessários durante o processo de aprovação (ZHANG; RADISIC, 2017; ZHANG et al., 2018). Para acelerar esse processo, é de extrema importância o desenvolvimento de novas tecnologias que permitam compreender o efeito dos medicamentos em diferentes células, em tempo real e em condições dinâmicas (CUI; WANG, 2019). Nesse sentido, os dispositivos microfluídicos são uma plataforma tecnológica promissora que pode ser explorada para observar e compreender fenômenos celulares bioquímicos e fisiológicos, (DAMIATI et al., 2018). Essa tecnologia utiliza geometrias micrométricas e cria microambientes biomiméticos (TIAN et al., 2019).

Dispositivos microfluídicos utilizados para ensaios de *drug screening* (BERRY et al., 2017; SHAKERI et al., 2019), podem auxiliar a obter informações importantes como: citotoxicidade, morte celular e sinalização celular. Dentre as diferentes abordagens, dispositivos *high-throughput* (HTS) e *high-content screening* (HCS), os vantajosos para testes de diferentes fármacos em diferentes concentrações (CHEN et al., 2016; WONG et

al., 2017). Os microdispositivos estilo *high-throughput*, com gradientes de concentração, podem ser utilizados como uma ferramenta para observar o comportamento celular para cada concentração e assim, estimar a dosagem adequada de um determinado medicamento (EDUATI et al., 2018).

Essa abordagem tem sido usada com sucesso para compreender o comportamento, por exemplo, de células cancerosas e células de pacientes com doenças neurodegenerativas (MI et al., 2016; ZHAI et al., 2019; MO et al., 2020)

Nesse contexto, para compreender melhor o processo de metástase, foi desenvolvido um microdispositivo, com gradiente de concentração para avaliar a eficácia de fármacos em células tumorais. O microdispositivo permite a avaliar da comunicação e sinalização das células de câncer de mama. Foi possível investigar simultaneamente o efeito de diferentes concentrações de medicamentos e identificar a condição ótima que inibe a migração de células cancerosas, para a corrente sanguínea, prevenindo a metástase celular (MI et al., 2016).

O uso de gradiente de concentração em microfluídica, também foi utilizado para avaliar o efeito do riluzole, medicamento usado para tratar a esclerose lateral amiotrófica. Neste caso, foram utilizados neurônios motores esferoidais derivados de células-tronco pluripotentes induzidas pelo homem (hiPSC). As células foram tratadas com thapsigargin, um reagente responsável por aumentar a concentração intracelular de cálcio, bloqueando a capacidade da célula de bombear cálcio para o retículo endoplasmático. Os autores observaram, uma redução significativa da neurotoxicidade mediada por thapsigargin nos neurônios motores, especialmente nas concentrações mais elevadas de riluzole (MO et al., 2020).

Além disso, é possível construir microdispositivos modulares, com o sistema HTS para que o cultivo de diferentes células ou o *screening* de diferentes fármacos de forma simultânea. Chen et al (2015) criaram um microdispositivo contendo 3 microcanais independentes com 30 microcanais para entrega efetiva de anticancerígenos e/ou nutrientes. Foram cultivadas no microdispositivo, três diferentes linhagens celulares de carcinoma (carcinoma de cólon - HCT116, carcinoma de mama -T47D e carcinoma hepatocelular - HepG2) de forma que fosse possível obter esferoides uniformes. Os

autores testaram dois fármacos (paclitaxel e doxorubicina) em três concentrações diferentes (CHEN et al., 2015), possibilitando observar os efeitos dos fármacos de forma individual e combinada (DONG et al., 2019).

No entanto, ainda há desafios envolvendo o projeto e a fabricação de microdispositivos para atender às necessidades de biólogos e pesquisadores da área médica. Um fator importante nas áreas biológicas e na área médica, é o processo de recuperação de células após um tratamento ou experimento, com intuito de realizar análises adicionais (i.e *western blot*) (ABHYANKAR et al., 2016). Os microdispositivos convencionais não permitem a recuperação de células, pois a retirada do material biológico no interior do microdispositivo é complexa.

Nesse sentido, o desenvolvimento dispositivo microfluídico para o cultivo de células animais que possuam selagem reversível, é uma solução viável para recuperação celular. A maioria dos microdispositivos para cultivo celular tem selagens irreversíveis para evitar que ocorra vazamento de fluidos, e assim evite possíveis contaminantes. No entanto, dispositivos de selagem irreversível são difíceis de esterilizar e assim, reutilizar o dispositivo (FONCY et al., 2016; SHIROMA et al., 2016). O uso da selagem reversível não só resolve esses problemas, mas possibilita a recuperação celular e a reutilização do dispositivo (PITINGOLO et al., 2019).

Neste capítulo, será abordado os resultados referentes ao projeto e a construção do microdispositivo modular com selagem reversível e reutilizável para o estudo do comportamento celular de forma fácil e segura. O microdispositivo foi construído de polidimetilsiloxano laminado (PDMS<sub>LAM</sub>), que permite a adesão do material com o vidro sem a utilização de nenhum tipo de selagem irreversível. Além disso o microdispositivo é totalmente reutilizável (mais de 10x). O material já foi utilizado pelo nosso grupo de pesquisa para construção de microdispositivos para cultivo de microrganismos (OLIVEIRA et al; 2016, VIT et al ;2018). No entanto, não há trabalhos na literatura que reportem o uso do PDMS<sub>LAM</sub> na construção de microdispositivos para cultivo de células animais e que sejam de conhecimento dos autores.

Foram realizados diferentes ensaios e análises no material, comparando-o com o seu análogo, o PDMS convencional, convencionalmente empregado na construção de

microdispositivos. Além das análises do material, também foram realizados ensaios para verificar a formação do gradiente de concentração no interior das câmaras de cultivo.

Como prova de conceito, foi utilizada a célula tumoral de mama (MCF-7) para os ensaios biológicos, e o fármaco modelo doxorrubicina (DOX) para os ensaios de *drug screening*. A funcionalidade do microdispositivo foi validada por meio de análise de imagens e ensaios de viabilidade celular. Dessa forma, os resultados aqui apresentados, mostram um microdispositivo inovador e de fácil operação.

## **4.2 Resultados e Discussão**

### **4.2.1 Avaliação das propriedades do PDMS laminado**

Dispositivos reversíveis vêm sendo empregados em nosso grupo de pesquisa com o propósito de explorar novas estratégias que auxiliem na compreensão de diferentes sistemas biológicos (OLIVEIRA et al., 2016a; VIT et al., 2018). Estes microdispositivos foram construídos a partir de folhas laminadas de polidimetilsiloxano laminado (PDMS<sub>LAM</sub>) associado ao vidro. Apesar de o PDMS<sub>LAM</sub> ter adesão ao vidro, essa adesão é fraca, quando comparada à obtida quando se utiliza plasma ou colas adesivas. A menor adesão reduz a resistência à pressão mecânica exercida pelo escoamento, restringindo a faixa de vazões que pode ser empregada. Em geral, estudos prévios observaram que vazões acima de 10  $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$  já são capazes de provocar perda de adesão e, consequentemente, vazamento dos fluidos confinados no microdispositivo (VIT et al., 2018; SOARES et al., 2019).

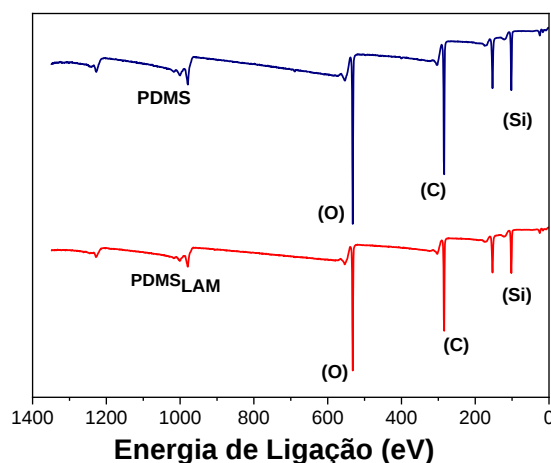
Apesar desta limitação, sistemas microfluídicos que requerem baixas vazões já se mostraram bem sucedidos para a obtenção de parâmetros de cinética de fermentação, tanto para leveduras quanto para bactérias, podendo ser analisados tanto por imagens quanto por sensores de fibra óptica integrados (VIT et al., 2018; SOARES et al., 2019).

A aplicação bem sucedida destes sistemas, por outro lado, requerem os conhecimentos das propriedades físico-químicas e mecânicas deste material, bem como a avaliação da sua resistência às condições de trabalho. Assim, foram realizadas caracterizações de composição química, morfológicas da superfície do material. Concomitantemente, foram realizados ensaios testando a sua resistência ao emprego de temperatura e calor úmido (condição de esterilização, requisito fundamental para o

trabalho com células animais). O PDMS convencional (curado), normalmente utilizado na construção de microdispositivos fluídicos, foi utilizado para comparação.

#### 4.2.1.1 Composição química elementar da superfície do material

A avaliação da composição química das superfícies de PDMS<sub>LAM</sub> e do PDMS foi realizada por XPS. Os espectros obtidos são mostrados na Figura 32.



**Figura 32:** Espectros XPS obtidos para amostras retangulares (2 mm x 2mm) dos materiais, previamente limpas e submetidas a vácuo: PDMS convencional (em azul) e PDMS<sub>LAM</sub> (laminado, em vermelho). FONTE: Vit et al (2021). Imagem reproduzida sob a autorização da Elsevier.

Foi observado que os espectros são perfeitamente paralelos, confirmando a presença dos mesmos elementos químicos na superfície: C, Si e O, o que era esperado para um silicone contendo apenas grupos metila (NENDZA, 2007). Para verificar cada componente, os espectros do C, Si e O foram separados e analisados individualmente (ANEXO II), para ambos os PDMS (convencional e laminado). Foi observado que os espectros são os mesmos, dado esse previamente observado por Mata et al. (2005), que submeteram o PDMS convencional a diversos tipos de tratamento superficial e analisaram os resultados por XPS (MATA; FLEISCHMAN; ROY, 2005).

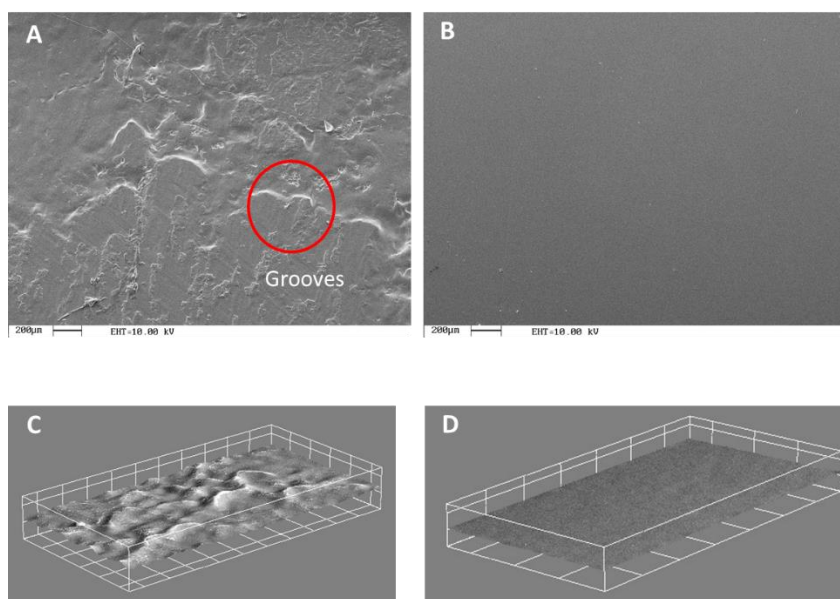
Contudo, apesar de possuírem mesma composição química, os materiais não apresentam a mesma adesão ao vidro. O PDMS<sub>LAM</sub> laminado é capaz de manter-se aderido ao vidro sem necessidade de processo de selagem por plasma, o que não ocorre com o PDMS convencional. Foi realizada, a análise de ângulo de contato, a qual fornece

informações sobre molhabilidade e hidrofilicidade, refletindo as forças e mecanismos de interação intermolecular da superfície (MATA; FLEISCHMAN; ROY, 2005).

Os experimentos foram conduzidos utilizando água como solvente, e resultaram em ângulos de contato de 95 e 110° para o PDMS<sub>LAM</sub> e PDMS convencional, respectivamente. Nas condições experimentais aplicadas, ambos os materiais foram considerados hidrofóbicos. Quando o ângulo formado entre o material e o solvente for menor que 90°, o material é considerado hidrofílico, ou seja, quanto menor o ângulo de contato formado entre o material e o solvente, maior é afinidade entre eles. Quando ângulos de contato com valores acima de 90° são observados, o material pode ser classificado como hidrofóbico (ângulos acima de 150° caracterizam um material como super-hidrofóbico).

Assim, os resultados mostram características hidrofóbicas para ambos os materiais. Porém, a adesão ao vidro de sílica (de características polares), mostra que o PDMS<sub>LAM</sub> provavelmente se situa em uma faixa de transição, com caráter levemente hidrofílico e parcialmente dependente das condições experimentais.

Outro aspecto que pode interferir na adesão e no crescimento celular é a morfologia da superfície do material. Esta foi analisada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) (Figura 33A-D).



**Figura 33:** Morfologia das superfícies dos materiais obtidas em microscopia eletrônica de varredura (MEV) e sob mesma magnificação. (A) Superfície do PDMS<sub>LAM</sub>, apresenta ranhuras uniformes (grooves – círculo em vermelho) ao longo de toda a superfície do material. (B) Superfície do PDMS convencional mostra-se lisa sem ranhuras. Imagens 3D da superfície do material tratadas no software ImageJ (3D surface plot) - (C) PDMS<sub>LAM</sub> e (D) PDMS convencional. FONTE: Vit et al (2021). Imagem reproduzida sob a autorização da Elsevier.

É possível notar na Figura 33A a presença de imperfeições superficiais inerentes aos materiais, como ranhuras (identificadas como *grooves*), diferente da Figura 33 B, que apresenta uma superfície lisa. Em conjunto com a visualização nas Figura 33 C e D, que apresentam as topografias das superfícies, os resultados sugerem que o PDMS<sub>LAM</sub> possui uma superfície mais rugosa que a do PDMS convencional.

Estas diferenças morfológicas são provavelmente consequência dos diferentes processos de produção, uma vez que, além da reação de cura, o PDMS<sub>LAM</sub> também foi submetido à etapa de laminação. Esta etapa consiste em um processo mecânico comumente utilizado para a fabricação de chapas poliméricas (MORMAN et al., 2011)

Neste processo, o polímero é submetido a aquecimento e extrusão, passando por uma sequência de rolos giratórios. O primeiro rolo pressiona o material, conferindo a ele a conformação de uma folha fina. O material é, então, resfriado até atingir a temperatura adequada para o armazenamento (MORMAN et al., 2011). Durante a estocagem, as folhas são pressionadas mecanicamente uma contra a outra e, dependendo da aplicação específica à qual o material se destina, pode ser feito o acréscimo de componentes para a melhoria das propriedades de engenharia. Este componente é colocado entre as folhas estocadas (WYNNE; MOHAMMED, 1998). Vale destacar também que, as velocidades dos rolos e a temperatura de extrusão são específicas de cada processo. Cada conjunto particular de parâmetros operacionais é escolhido de modo a aperfeiçoar a aderência entre as folhas, sem que comprometa as propriedades do elastômero.

Além disso, alguns processos utilizam rolos com geometrias especiais capazes de orientar as cadeias poliméricas. Existem ainda as matrizes que formam folhas de conformação modificada (KOBAYASHI; ISHIKAWA; MITSUNO, 2002) que podem apresentar, por exemplo, ranhuras projetadas para serem cortadas ou sofrer ruptura direcionada (WYNNE; MOHAMMED, 1998).

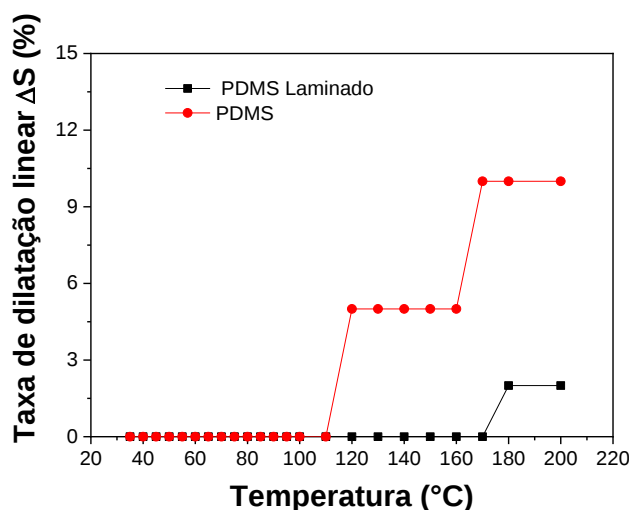
Também foi observado as altas tensões e taxas de cisalhamento combinadas ao incremento de temperatura e ao movimento circular imposto pelos rolos comumente tende a alinhar as cadeias macromoleculares. Assim, as cadeias poliméricas assumem orientações preferenciais, e em geral se alinham paralela ou perpendicularmente à direção do movimento relativo entre os rolos e as folhas (ZHOU; NECULESCU; GARRETT, 2005). Porém, o projeto cuidadoso do sistema permite a obtenção de cadeias orientadas de acordo com ângulos bem definidos.

A presença de ranhuras orientadas, tais como as observadas para o PDMS<sub>LAM</sub>, e que provavelmente são consequência do seu processo de produção, é capaz de explicar as diferentes adesões, como mostrado por He et al (2008). Estes pesquisadores analisaram a microestrutura de elastômeros submetidos ao processo de laminação, e observaram a presença de ranhuras altamente orientadas, semelhante às observadas nas Figura 33A e C (HE; CHEN; JANE WANG, 2008). De acordo com eles, estas ranhuras são responsáveis por aumentar o atrito estático, gerando uma anisotropia no atrito (anisotropia maior na direção das ranhuras), aumentando as forças de adesão do material.

Portanto, a análise microscópica da superfície auxilia na elucidação do motivo de haver maiores adesões entre o PDMS<sub>LAM</sub> e o vidro e entre as próprias camadas de PDMS<sub>LAM</sub> do que o observado para o material convencional, mesmo quando nenhum processo de selagem é empregado.

#### 4.2.1.2. Resistência mecânica a temperatura e esterilização

A fim de avaliar a presença de deformações irreversíveis do dispositivo causadas por condições de temperatura e pressão drásticas, às quais um sistema destinado ao estudo de células animais deve ser submetido, foram feitos os ensaios descritos na Seção 2.2.3. Nesse ensaio foi avaliado a taxa de deformação em função do aumento da temperatura (Figura 34).



**Figura 34:** Perfil da dilatação do elastômero com o aumento da temperatura (amostras cortadas em quadrados de 2 x 2 mm). As amostras foram expostas a cada uma das temperaturas por 20 min e então resfriadas à temperatura ambiente. Em seguida, as dimensões foram novamente avaliadas. FONTE: Vit et al (2021). Imagem reproduzida sob a autorização da Elsevier.

Dentre as diversas matrizes elastoméricas de silicone disponíveis, o PDMS é uma das mais utilizadas devido às suas propriedades complementares e bastante interessantes para a aplicação biomédica. Em particular, o PDMS mostra excelentes propriedades termo-mecânicas. Ele comumente se apresenta como um polímero elastômero semicristalino de baixo grau de emaranhamento molecular, com temperatura de fusão  $\sim -40$  °C, cristalização em  $-90$  °C, e temperatura de transição vítrea de cerca de  $-125$  °C, com cinética de vitrificação bastante lenta (BOSQ et al., 2014). Não bastasse, a cura térmica ocorre a temperaturas relativamente baixas, o que possibilita curá-lo em conjunto com outros polímeros. Isto porque a maioria destes materiais não resiste a temperaturas acima de 200 °C (CHOW et al., 2006).

Os resultados da apresentados Figura 34 confirmam as boas propriedades térmicas esperadas para o PDMS. É possível notar que o aquecimento a 110 °C resultou em 5% de dilatação do PDMS, e uma dilatação de 10% foi observada para temperaturas acima de 170 °C. No caso do PDMS<sub>LAM</sub>, ocorre uma dilatação de 3% após o aquecimento a  $\sim 170$  °C, mantendo-se aproximadamente constante durante o restante do intervalo testado (até 200 °C).

Portanto, observa-se que o material laminado apresenta maior resistência a sofrer dilatações térmicas irreversíveis, que o material convencional. O processo de laminação confere boas propriedades termo-mecânicas, uma vez que o polímero pode ser submetido a temperaturas de até 160 °C sem se deformar. Dessa forma, o material possibilita a esterilização por altas temperaturas sem deformação e podendo ser reutilizável.

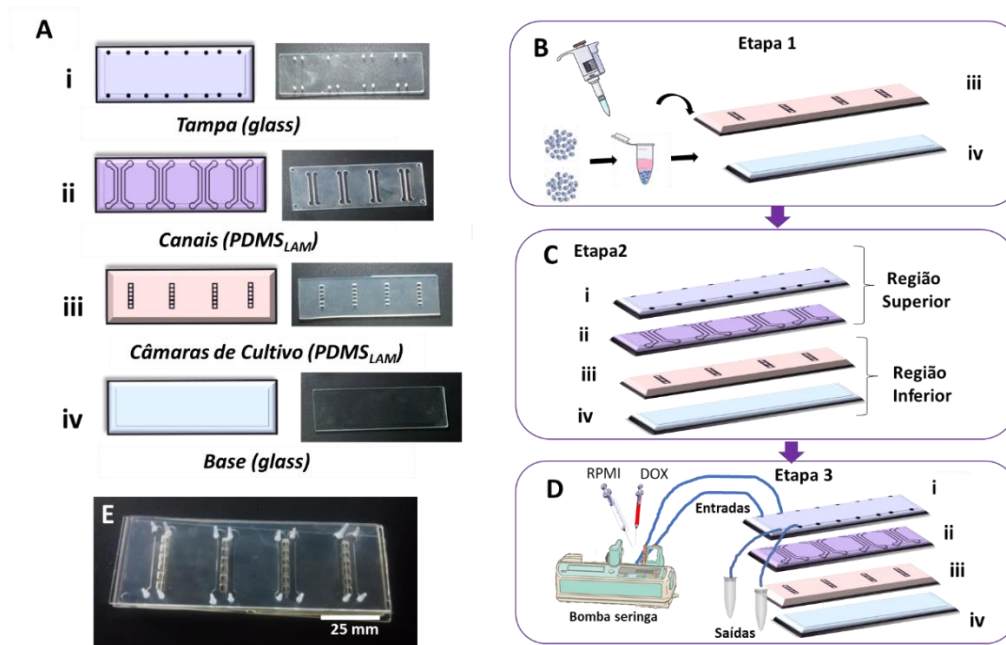
As mesmas características podem ser observadas quando o sistema é submetido a sucessivos ciclos (5 no total) de autoclavagem (esterilização por calor úmido, em ambiente pressurizado). O PDMS<sub>LAM</sub> não sofreu deformação ou alterações visíveis de adesão ao vidro ou coloração (requisito importante para permitir a observação das células em microscópio óptico). Enquanto isso, o PDMS convencional sofreu deformação de cerca de 5% a partir do terceiro ciclo de esterilização, e passou a apresentar mudança irreversível na coloração, tornando-se levemente amarelada.

Vale ressaltar, a importância de o PDMS<sub>LAM</sub> combinar as propriedades mecânicas e térmicas superiores ao fato de apresentar a mesma composição química na superfície do material que o PDMS convencional. Uma vez que ambos os materiais possuem as propriedades químicas semelhantes, e que o PDMS convencional é amplamente utilizado em processos biológicos, principalmente para a construção de microdispositivos para cultivo de células animais (KWAPISZEWSKA et al., 2014b; ZHANG et al., 2016; TANYERI; TAY, 2018), pode-se inferir que o PDMS<sub>LAM</sub> possui as mesmas características em termos de biocompatibilidade. O PDMS<sub>LAM</sub> é, portanto, uma alternativa viável para a construção de microdispositivos reversíveis, pois é reutilizável e pode ser esterilizado.

#### **4.2.2 Projeto e construção do microdispositivo**

Após verificar que o material utilizado para a construção do microdispositivo possui características químicas de superfície semelhantes às do PDMS convencional. O PDMS<sub>LAM</sub> foi utilizado para a fabricação do microdispositivo. O microdispositivo foi construído em camadas, sendo a base e o topo fabricados com vidro, e as camadas intermediárias (paredes das câmaras de cultivo e das correntes de entrada) construídas com PDMS<sub>LAM</sub>.

O microdispositivo reversível foi projetado contendo 4 camadas independentes, e possui duas regiões, conforme apresentado na Figura 35.



**Figura 35:** Diagrama esquemático do microdispositivo reversível., incluindo a etapa de montagem: (A) Partes integrantes do microdispositivo, composto por: (i) tampa de vidro composta orifícios para conexão de mangueiras, que permitem o bombeamento de fluidos até os canais de laterais e a coleta na outra extremidade; (ii) microcanais laterais, construído em PDMS<sub>LAM</sub> (são 4 módulos independentes que permitem experimentos em paralelo – cada módulo possui duas entradas e duas saídas); (iii) unidade construída em PDMS<sub>LAM</sub>, e que constitui as paredes das câmaras de cultivo. Em cada módulo, existe 6 microcâmaras que permitem replicar os experimentos; (iv) base da câmara de cultivo, em vidro; (B) Etapa 1: É montada a parte inferior, contendo a base e as câmaras de cultivo e logo, são inoculadas as células nas câmaras de cultivo. (C) A Etapa 2: consiste em juntamente com a parte inferior, adicionar a parte superior contendo os microcanais e a tampa, após de montado o microdispositivo preenchido com meio e incubado a 37°C.; (D) Etapa 3: Após 24 h, o microdispositivo está pronto para o ensaio com fármaco, (E) Imagem do microdispositivo completamente montado. FONTE: Vit et al (2021). Imagem reproduzida sob a autorização da Elsevier.

O microdispositivo possui 4 módulos que podem ser utilizados de forma independente. A região superior é composta por uma tampa de vidro que permite as entradas e saídas de fluidos (Figura 35Ai). Figura 35Aii apresenta os microcanais (2mm de largura, 18 mm de comprimento e 0,5 mm de altura), construídos em PDMS<sub>LAM</sub>, que são os responsáveis por distribuir meio de cultura e /ou reagentes para as câmaras de cultivo. A região inferior, por sua vez, é formada pelas câmaras de cultivo (Figura 35Aiii),

onde as paredes laterais das câmaras de cultivo são formadas por PDMS<sub>LAM</sub> e uma base em vidro (Figura 35Aiv). Em cada módulo, existem 6 câmaras de cultivo, que são utilizadas como replicatas do experimento. Os fluxos laterais em ambos os lados permitem a transferência de massa (predominantemente por difusão)

Cada câmara de cultivo possui uma área de 4 mm<sup>2</sup> e altura de 1500 µm, facilitando a inoculação manual das células com auxílio de micropipetas. Para facilitar a adesão das células ao microdispositivo, as bases das câmaras de cultivo foram tratadas com uma solução de poli L-lisina 0,1% m/v (UDOMRAT et al., 2018) antes da etapa de montagem, o que não prejudicou a adesão do vidro ao PDMS<sub>LAM</sub>.

A etapa de montagem do microdispositivo foi realizada de forma manual, iniciando-se pela montagem da região inferior (Figura 35B), contendo a base e a parede das câmaras de cultivo (Figuras. 35Aiv e 35Aiii, respectivamente). Em seguida, procede-se à inoculação manual das células em cada uma das câmaras de cultivo. A inoculação manual impede que ocorra bolhas de ar dentro das câmaras de cultivo. Paralelamente (Figura 35B), une-se a região superior do microdispositivo que contém os microcanais (Figura 35Aii) e a tampa de vidro (Figura 35Ai). Por fim, as partes inferior e superior são alinhadas manualmente e conferido o alinhamento em microscopia óptica comum. Para facilitar o alinhamento, foram recortados furos de 1 mm nas 4 bordas, nas camadas de PDMS onde fica os canais e nas paredes das microcâmaras de cultivo. As superfícies devem estar perfeitamente secas e limpas para permitir a adesão eficiente entre as faces de PDMS<sub>LAM</sub>. Uma vez aderidas as camadas, não há vazamento de fluídos entre as mesmas.

Após a montagem, o microdispositivo foi alimentado com meio de cultivo, impedindo que haja carência de nutrientes para as células (inoculadas na etapa de montagem). O dispositivo operou com uma vazão de operação de 7 µL.min<sup>-1</sup>, para a qual não foram observados perda de adesão e vazamentos (VIT et al., 2018). Outro fator relevante é que os diferentes módulos projetados possibilitam realizar ensaios em replicatas (6 amostras por módulo - 24 câmaras de cultivo no total) e em condições diferentes ou ainda com linhagens celulares diferentes, Figura 35Aiii). O projeto também possibilita o escoamento em paralelo de duas correntes laterais com meio de cultivo e/ou fármacos, permitindo que as células sejam submetidas a um gradiente difusivo de

concentração (Figura 35C). O projeto de geometria das câmaras de cultivo também foi realizado de modo a possibilitar a estabilização das concentrações no interior das câmaras no menor tempo possível (45 min).

Para validar a reprodutibilidade do processo de fabricação dos microdispositivos, foram construídos 4 microdispositivos, com as mesmas configurações. As medidas dos canais e das câmaras de cultivo foram mensuradas e por meio da análise de ANOVA, foram obtidas as diferenças amostrais entre as câmaras de cultivo e os canais. As câmaras de cultivo tiveram uma diferença de 0,5% entre as áreas das microcâmaras (do mesmo dispositivo), e os canais tiveram uma diferença de 1,25% entre eles. Quando comparamos dispositivos diferentes, a diferença das médias das áreas das microcâmaras de cultivo é de 2,75% e dos canais 5,5 %. O teste de Tukey, realizado tanto para comparar as diferenças das médias áreas das microcâmaras de cultivo e os canais do mesmo dispositivo e entre os microdispositivos, não apresentaram diferenças estatísticas significativas entre as geometrias (canais e microcâmaras).

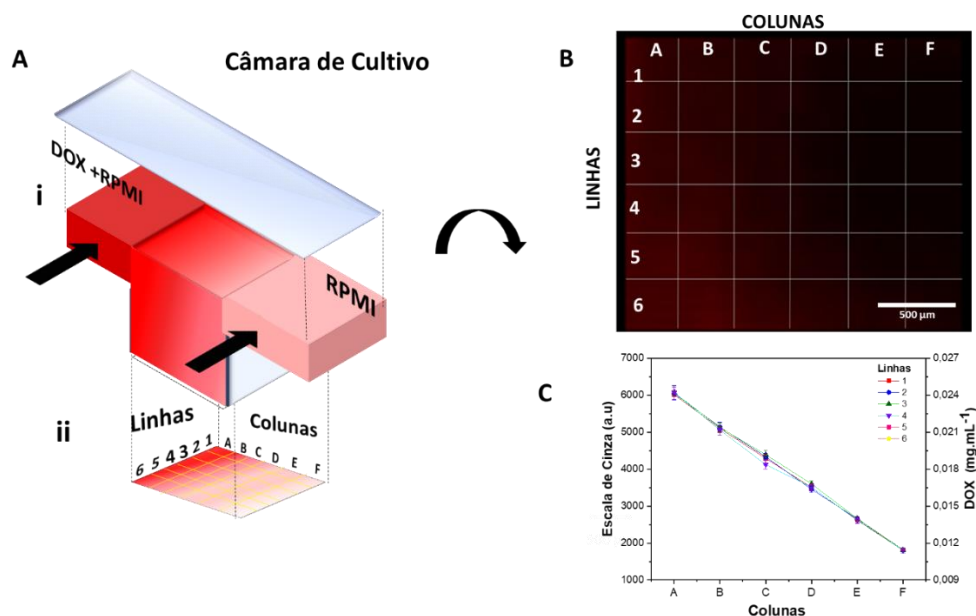
Esses resultados comprovam que a técnica utilizada (ablação de laser de CO<sub>2</sub>) é reprodutível e rápida para a fabricação de um número elevado de microdispositivos, no entanto, ao longo do tempo há a diminuição da acurácia do laser e isso leva a manutenção trabalhosa. Como alternativa, há técnica de xurografia (NEUVILLE et al., 2017), que por meio de uma plotter (utilizando um conjunto de lâminas) de baixo custo, permite obter microdispositivos nas dimensão de até 500 micrometros a mesma acurácia e rapidez da técnica de ablação a laser.

#### **4.2.3 Avaliação do gradiente de concentração baseado em difusão**

Os métodos tradicionais de *screening* geralmente envolvem testar diferentes concentrações de um fármaco e avaliar parâmetros tais como a concentração ótima para inibir o crescimento de 50% das células. São procedimentos extremamente exaustivos, devido aos longos tempos de análise, e de alto custo relacionado à aquisição de volumes suficientes de fármacos e reagentes para todas as análises. Assim, dispositivos microfluídicos capazes de gerar gradiente de concentração podem ser vantajosos, uma vez que consomem baixas quantidades de células e de reagentes. A geração do gradiente de concentração permite a observação simultânea do comportamento celular frente a

diversas concentrações de fármaco em um único ensaio (OLIVEIRA et al., 2016a; VIT et al., 2018)

Para avaliar a capacidade do microdispositivo projetado em gerar gradiente difusivo de concentração ao longo da geometria das microcâmaras de cultivo, foi utilizado o fármaco fluorescente do doxorrubicina. Em uma das entradas foi escoada uma solução contendo doxorrubicina ( $0.025 \text{ mg. mL}^{-1}$ ) e meio de cultura (DOX+RPMI) enquanto a outra foi alimentada apenas com meio RPMI (Figura 36A). A técnica de microscopia de fluorescência mostrou a estabilização do fluxo difusivo em 45 minutos (Figura 36B). Assim, após este período, foram obtidas imagens de três câmaras de cultivo ao longo de 1h (triplicatas), e estas foram tratadas e analisadas com o software ImageJ (Figura 36C), descontando as bordas das microcâmaras de cultivo (volume morto). Vale ressaltar que após 45min (tempo para estabilizar o gradiente de concentração), não houve variação das intensidades de fluorescência. Primeiramente, para as análises foi construída uma curva analítica, relacionando a concentração de DOX, com a fluorescência (em pixel) emitida (ANEXOII). Após, as câmaras foram subdivididas em sub-regiões virtuais, de acordo com a metodologia adaptada de Oliveira et al. (2016).



**Figura 36:**Esquema ilustrativo do perfil de concentração dentro da câmara de cultivo: (A) (i) Diagrama esquemático ilustrando a formação do gradiente de concentração, a partir da alimentação simultânea nas duas correntes laterais com doxorrubicina e meio de cultura (DOX- $0.025 \text{ mg.mL}^{-1}$ +RPMI) e meio de

cultura (RPMI) ; (ii) Projeção de uma das câmaras de cultivo, indicando a subdivisão virtual em linhas (1-6) e colunas (A-F); (B) Imagem da câmara de cultivo após 45 min, com a divisão em linhas e colunas; (C) Perfil de intensidade de fluorescência ao longo das linhas virtuais. O experimento foi realizado durante 60 min, mantendo-se vazão constante e igual a  $7 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$  em ambas as correntes laterais. FONTE: Vit et al (2021). Imagem reproduzida sob a autorização da Elsevier.

A avaliação do gradiente de concentração (Figura 36Ai) foi feita pela subdivisão da câmara de cultivo em linhas (1-6) e colunas (A -F) virtuais (Figura 36Aii), com distâncias de 0,062 mm entre si. Para cada região quadrada delimitada por esta matriz, avaliou-se a intensidade de fluorescência média emitida pelas moléculas de doxorubicina, propriedade física proporcional à sua concentração (Figura 36B).

Observa-se que há correlação entre a fluorescência detectada e a coluna da matriz. Assim, a coluna A apresenta intensidade de fluorescência maior que as colunas subsequentes, conforme apresentado na Figura 36C. A fluorescência ao longo das colunas decresce de maneira linear à medida que se afasta da corrente (DOX+RPMI) em direção à corrente (RPMI), o que era esperado de um gradiente de concentração difusivo (de acordo com a Lei de Fick-WELTY et al., 2001). Para uma mesma coluna, todas as linhas mostram aproximadamente a mesma intensidade de fluorescência (a concentração varia na direção perpendicular (nas linhas) às correntes laterais).

O microdispositivo possibilita, portanto, entender a resposta celular em diferentes concentrações de um reagente químico. Isso porque é possível analisar o efeito simultâneo de até 6 concentrações de fármaco.

Atencia, Cooksey e Locascio (2012) desenvolveram um dispositivo microfluídico com três câmaras de cultivo, capaz de criar um gradiente de concentração puramente difusivo para o estudo de processos biológicos que envolvem gradientes químicos estáticos ou dinâmicos, como a quimiotaxia. Os pesquisadores utilizaram para os ensaios células de rim de macaco verde africano (VERO cells) modificado para expressar Green fluorescence Protein (GFP). Em uma das entradas foi bombeada uma toxina (cicloheximida- CHX) e na outra meio de cultura. As células foram expostas a diferentes concentrações de uma toxina dentro de um gradiente de concentração por 48 horas. Após esse período, as células passaram por um ciclo de ativação e desativação do gradiente, e a resposta celular foi monitorada usando microscopia de fluorescência. À

medida que a concentração CHX aumentava, a intensidade de fluorescência das células diminuía, devido a morte celular, comprovando a existência de um gradiente de concentração difusivo(ATENCIA; COOKSEY; LOCASCIO, 2012).

Em outro trabalho, Abbas et al (2017) desenvolveram um microdispositivo que permite verificar a migração de células primárias de trofoblastos extravilosos humano. Os trofoblastos extravilosos são células importantes para o processo de placentação. Sinalizadores celulares como as citocinas, o oxigênio e interações célula-célula regulam a invasão e a placentação de trofoblastos, que dependendo da forma como ocorre pode causar problemas durante o primeiro trimestre da gestação. Para esse estudo o microdispositivo construído em PDMS convencional (dispositivo não reversível), utilizando a técnica litografia macia. O microdispositivo possui três canais planares interligados, cada canal tem 4,5 cm de comprimento e 2,3 cm de largura. As células foram inoculadas no canal central juntamente com Matrigel®, e incubadas *overnight*. Após a polimerização da Matrigel®, foi escoado em um dos canais adjacentes meio contendo uma concentração elevada de estimuladores de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF), que funcionam como citocinas (sinalizador), e no outro canal meio contendo uma baixa concentração de GM-CSF. O comportamento celular observado por 12 h usando imagens de alta resolução em tempo real. Foi observada a formação de um gradiente linear de GM-CSF em toda a extensão do Matrigel®. Os autores perceberam que havia uma maior motilidade celular na direção onde a concentração média de GM-CSF era mais elevada(ABBAS et al., 2017).

No microdispositivo proposto por Atencia; Cooksey e Locascio, (2012), cada câmara de cultivo apresenta uma área de  $1,8 \text{ mm}^2$ , praticamente a metade da área do microdispositivo proposto nesse trabalho ( $4 \text{ mm}^2$ ). Por possuir uma área de análise maior, propícia uma amostragem em número de célula maior, consequentemente uma análise estatística mais robusta. No caso do trabalho de Abbas (2017) a área dos canais no qual as células são inoculadas é de  $10,35 \text{ cm}^2$ , apesar de apresentar uma área maior, o sistema apresentado não possibilita ter replicatas. Os autores também verificaram que o tempo para polimerizar a matriz foi de 45 min e cerca de 60 min para estabilizar o gradiente de concentração. Uma possibilidade para o tempo levado, deve-se as dimensões dos canais planares projetados no microdispositivo. Por outro lado, o microdispositivo desenvolvido

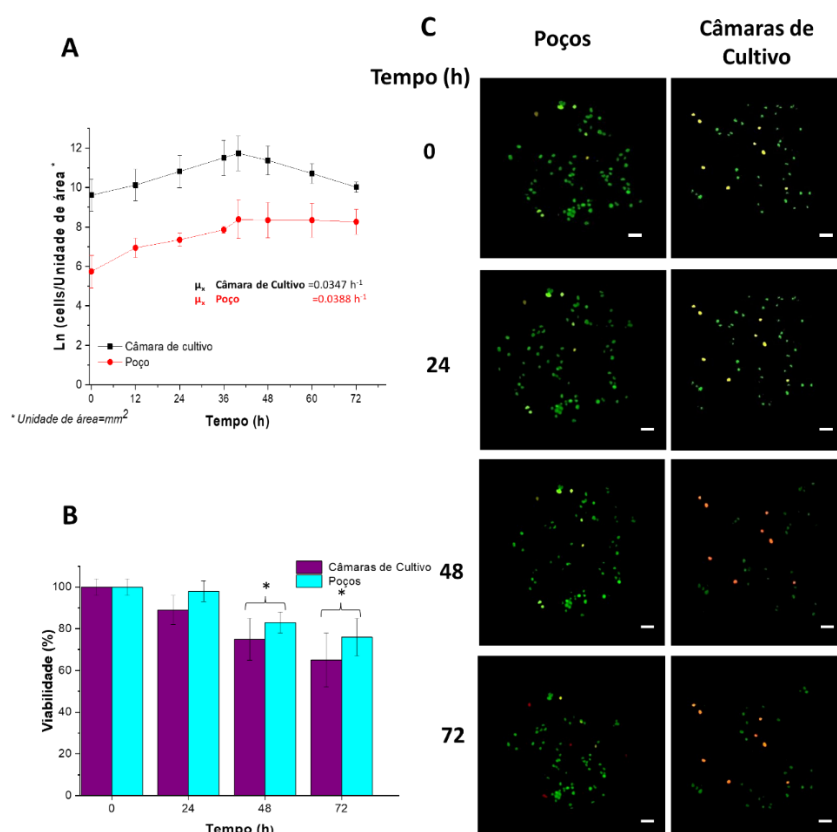
em nosso grupo de pesquisa, requer menor tempo de polimerização da matriz, sendo de 20 min, e para estabilizar o gradiente de 45 min. Vale ressaltar que, o microdispositivo conta ainda com 4 módulos independentes contendo em cada um dos módulos 6 câmaras de cultivo, o que permite ampliar ainda mais a área de aquisição de dados e trabalhar em diferentes condições em um único ensaio.

#### **4.2.4 Cultivo de celular nas microcâmaras**

Após a construção do microdispositivo e da verificação do gradiente de concentração, o sistema foi analisado com relação à possibilidade de cultivo e a observação da viabilidade de células animais, utilizando-se para isso células de câncer de mama (MCF-7). As células foram inoculadas nas várias microcâmaras presentes no microdispositivo e, para que não ocorresse limitação de nutrientes, foram realizadas troca do meio de cultivo a cada 24h. O crescimento e a viabilidade das células foram acompanhados durante 3 dias de cultivo (72h), utilizando dois microdispositivos. Como referência, o cultivo também foi realizado da forma convencional em placa (condições de cultivo similares).

##### 4.2.1 Crescimento e viabilidade celular

O comportamento celular foi avaliado através do monitoramento da taxa de crescimento ( $\mu_x$ ) da viabilidade celular, conforme apresentado na Figura 37. Como estes dois parâmetros estão intrinsicamente relacionados, apenas as células viáveis foram contabilizadas para a construção do perfil do crescimento celular.



**Figura 37:** (A) Perfil do crescimento celular ao longo do tempo. A curva em vermelho corresponde ao cultivo em placas e a curva em preto ao cultivo em microdispositivo, tendo sido calculada a velocidade específica de crescimento celular  $\mu_x$  para ambos os cultivos (poço e em câmara de cultivo). (B) Viabilidade celular do cultivo em placas (azul) e em microdispositivo (roxo). A ANOVA para os cultivos não apresentaram diferenças estatísticas para um intervalo de confiança de 95 %. As células foram cultivadas durante 72 h (3Dias) na concentração inicial de 60.000 células. mL<sup>-1</sup>. O meio RPMI utilizado foi trocado a cada 24 h. (C) Imagem da viabilidade celular em diferentes tempos, em câmara de cultivo e poços (escala de 50 $\mu$ m). As imagens foram obtidas em microscopia de fluorescência com objetiva de 20x. FONTE: Vit et al (2021). Imagem reproduzida sob a autorização da Elsevier.

Na Figura 37A, as curvas de crescimento são apresentadas em termos do quociente entre o número de células a cada instante pela área total (mm<sup>2</sup>) do microdispositivo ou pela área individual de cada poço presente na placa de cultivo. As células foram cultivadas ao longo de 72 h (3 dias) e a contagem foi repetida a cada 12 h para a construção da curva de viabilidade celular (Figura 37B).

Não houve diferença significativas (ANOVA e Tuckey  $p < 0,05$ ), entre a crescimento celular em ambas as técnicas (cultivo em placas/poços e microdispositivos).

No entanto, apesar de haver uma diferença de densidade celular entre os poços e as câmaras de cultivo, os perfis de crescimento têm características similares. Nota-se a partir de 48h, uma pequena queda no número de células cultivadas no microdispositivo, devido à diminuição da viabilidade celular. No entanto, mesmo ocorrendo o decréscimo celular no após 72h, a taxa de crescimento específico celular ( $\mu_x$ ) não foi afetada. Isto pode ser comprovado pelos valores obtidos de  $\mu_x$  para cada um dos cultivos: sendo de  $0,0347 \text{ h}^{-1}$  e  $0,0388 \text{ h}^{-1}$  para cultivo em placa convencional e em microdispositivo, respectivamente.

Para a análise estatística, o perfil do crescimento celular e a viabilidade foram avaliados a partir das médias das replicatas (6 microcâmaras e 6 poços), em 3 experimentos independentes. Os valores obtidos foram avaliados por meio da ferramenta de análise de variância (ANOVA), para um nível de confiança de 95% (avaliação da diferença entre os intervalos de confiança das médias) e o teste de Tukey para avaliar se as diferenças apresentadas pelas médias são significativas.

As viabilidades celulares para ambos os cultivos não apresentaram diferenças durante as primeiras 24h, ou seja, não foram detectadas variações significativas entre  $N_0$  (número de células inicial) e  $N_{24}$  (número de células após 24 h) (Figura 37B). Após 72 h de cultivo foi possível notar uma diminuição da viabilidade celular, no caso do cultivo realizado no microdispositivo. No entanto, a análise da variância (ANOVA) e o teste de Tukey, no intervalo de 95% ( $p < 0,05$ ) de confiança, não apresentou diferenças estatística significativas para a viabilidade celular, quando se compara os dois métodos de cultivo durante as primeiras 24h (Tabela 1).

**Tabela 1:** valores de viabilidade celular (%) e crescimento celular ( $N/N_0$ ). As células foram mensuradas por 72 h (4 dias). Para a viabilidade foi calculada a porcentagem de células viáveis ao longo do tempo e o crescimento foi normalizado (N) pelo número inicial de células ( $N_0$ ).

| Tempo<br>(h) | Viabilidade (%) |                  | Crescimento celular (N/N0) |                  |
|--------------|-----------------|------------------|----------------------------|------------------|
|              | Placa           | Microdispositivo | Placa                      | Microdispositivo |
| 0            | 100±3           | 100±2            | 2,30259 ±0,53              | 5,01064±0,41     |
| 12           | 100±4           | 98±2             | 2,78809 ±0,39              | 5,4161±032       |
| 24           | 98±4            | 93± 6            | 3,05636 ±0,31              | 5,92693±0,28     |
| 36           | 91±6            | 90±12            | 3,61419 ±0,23              | 6,21461±0,30     |
| 48           | 86±12           | 75±21            | 3,80666 ±0,18              | 6,30992±0,32     |
| 60           | 79±17           | 70±23            | 3,91202 ±0,20              | 6,30992±0,29     |
| 72           | 76±18           | 65±24            | 3,91202 ±0,18              | 6,10925±0,21     |

Essas diferenças entre a densidade e a viabilidade celular, está relacionado ao método de cultivo, uma vez que na placa, por ter um volume maior, há mais nutrientes ao longo do tempo que no microdispositivo (Figura 37C).

Além disso, se compararmos a massa de fármaco para o número de célula, haverá sempre mais fármaco disponível (proporção fármaco/célula) nas câmaras que nos poços (cerca de 10x). Mesmo não ocorrendo o escoamento de forma dinâmica, a diferença de volumes entre os poços (400µl) e as câmaras (4 µL), irão contribuir para ocorrer essa diferença de densidade e viabilidade, uma vez que há restrição de nutriente nas câmaras.

Uma possibilidade para solucionar esse problema, seria a troca de meio de cultivo no microdispositivo a cada 12h (2X ao dia), invés a cada 24h. No entanto, mesmo ocorrendo um decréscimo no número de células após 48h, não houve implicações nos valores da velocidade específica de crescimento e nem na morfologia celular (ANEXO II). Uma vez que os experimentos ocorrem em uma janela de observação menor que 24h (cerca de 10h) e visto que nesse intervalo de tempo não há diferenças significativas entre

os dois tipos de cultivos, é possível analisar de forma confiável o comportamento celular frente às diferentes concentrações de fármaco, sem comprometimento dos resultados obtidos.

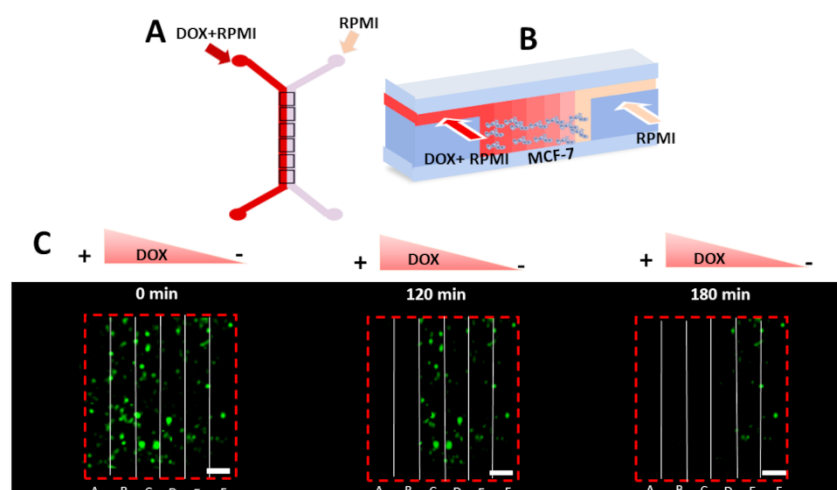
#### 4.2.5 Comportamento celular em diferentes concentrações de fármacos

Uma vez avaliadas a formação de gradiente de concentração difusivo linear nas câmaras de cultivo, bem como a viabilidade do cultivo das células no microdispositivo, realizou-se o estudo do efeito do cultivo celular na presença do gradiente de concentração de DOX. Este fármaco foi escolhido como medicamento-modelo por já ser bastante empregado para o tratamento de diversos tipos de tumores. É, portanto, o reagente ideal para a compreensão do funcionamento e da potencialidade do microdispositivo projetado.

A etapa de pré-cultivo das células (anterior à inoculação nos microdispositivos) foi realizada da mesma maneira que mencionado previamente (em garrafas de cultivo). Em seguida, as células foram inoculadas nas câmaras de cultivo do microdispositivo e incubadas por 4 h a 37 °C. As células foram incubadas por 4h, pois nesse tempo, não há o aumento do número de células.

Após este período, a formação do gradiente de concentração foi promovida por meio do escoamento de duas soluções: doxorubicina (0,025 mg.mL<sup>-1</sup>) diluída em meio de cultivo (RPMI sem soro fetal bovino e antibiótico) em uma entrada, e apenas RPMI (sem soro e sem antibiótico) na outra (Figura 38 A e B). Ambas as correntes foram submetidas a vazão constantes e iguais a 7 µL.min<sup>-1</sup> por 3h (180 min) e 45 min (ver imagem *set up* ANEXO II).

Após os 45 min necessários para a estabilização do gradiente de concentração no interior das câmaras de cultivo, foram obtidas imagens a cada 30 minutos (*time lapse*) por 180 min. Para facilitar as análises, as câmaras foram subdivididas virtualmente da mesma forma feita anteriormente para o ensaio de gradiente (formando quadrantes) (Figuras 38B), e o número de células em cada tempo e em cada quadrante foi contabilizado automaticamente por uma rotina em MATLAB e as células foram normalizadas pelo número de células no tempo inicial (N0) em cada um dos quadrantes (Figura 38 C).



**Figura 38:**(A) Diagrama esquemático do microdispositivo, apresentando as 6 câmaras de cultivo. Em uma das entradas foi escoada a DOX ( $0,025 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) + RPMI e, na outra entrada, meio RPMI. (B) Vista transversal da câmara de cultivo, onde o gradiente de concentração foi formado. (C) Imagens das células MCF-7 no interior das câmaras de cultivo em diferentes tempos (0, 120 e 180 min). As células foram marcadas com marcador Calceína-AM e foi utilizada microscopia de fluorescência. Foram utilizados os filtros de contraste de fases e Alexa fluore (550nm) at 10x magnification. Imagens obtidas por microscopia óptica, utilizando-se contraste de fase e objetiva de magnificação de 10x. FONTE: Vit et al (2021). Imagem reproduzida sob a autorização da Elsevier.

A Figura 38C apresenta imagens da câmara de cultivo em diferentes tempos de tratamento com o gradiente de concentração de DOX. Para fazer a análise, foi levada em consideração a quantidade de células iniciais em cada um dos quadrantes (as divisões virtuais das câmaras). Foi aplicado o filtro de contraste de fases, o qual utiliza um sistema de lentes que transforma diferenças de fase em diferenças de intensidade. Porções escuras da imagem correspondem a porções densas em células, enquanto que as porções claras correspondem a regiões menos densas. Devido a estas características, o filtro permite verificar a integridade de células e tecidos sem a necessidade de utilização de marcadores. Além disso, as regiões onde foi observada ruptura da matriz (Matrigel®) ou a presença de células agrupadas foram desconsideradas para o monitoramento. Assim, a título de contagem, foram consideradas apenas as células individuais.

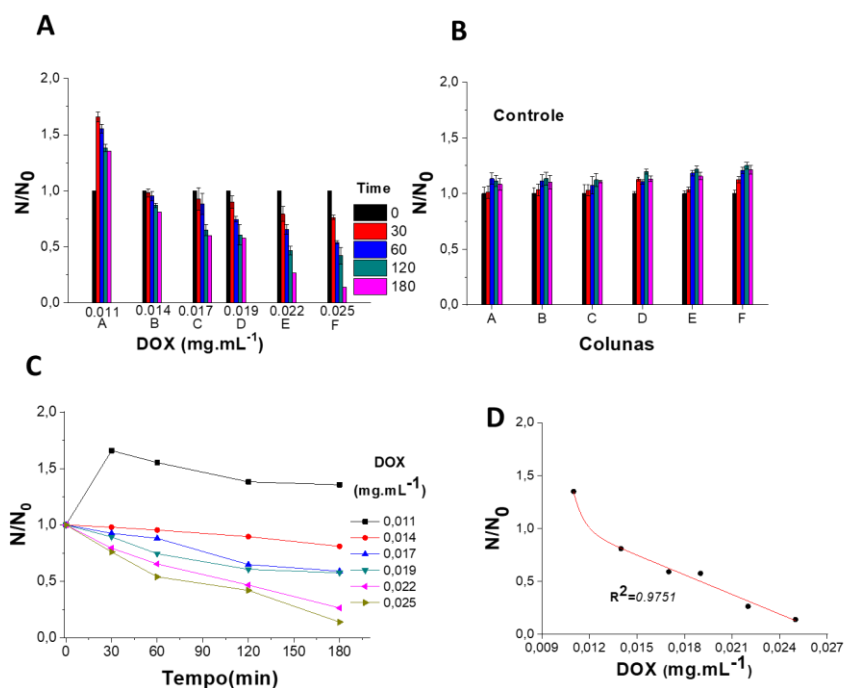
É possível notar na Figura 38C que, à medida que a concentração de DOX aumenta, também ocorre a redução da quantidade de células viáveis, comportamento que é

potencializado ao longo do tempo. Assim, é possível visualizar o decréscimo do número de células onde a concentração de DOX maior.

Após a coleta de imagens, as figuras foram pré-tratadas em ImageJ para aumentar os contrastes, e então as células presentes em cada quadrante foram contadas pela rotina em MATLAB. Foi obtido o número de células por área ao longo do tempo para cada quadrante (cada quadrante- nas linhas- corresponde a uma concentração de DOX), como mostra a Figura 39 A. Foi possível contabilizar o efeito do número de células para cada uma das 5 concentrações médias diferentes geradas no microdispositivo. Uma vez que o fluxo das correntes se manteve constante, as concentrações permaneceram inalteradas ao longo dos 180 min de avaliação. Vale notar que, o número de células foi normalizado pelo número inicial de células em cada um dos quadrantes, a fim de realizar um controle para comparação, foi também obtido o perfil do número de células ao longo do tempo para a situação de ausência de DOX, isto é, quando não é gerado nenhum gradiente de concentração de fármaco (Figura 39).

É possível verificar na Figura 39 A que, para a concentração média de  $0,011 \text{ mg.mL}^{-1}$  de DOX, ocorre um aumento de 60 % do número de células durante os primeiros 30 min e, após 60 min, segue-se uma fase de declínio celular. Porém, esta concentração de fármaco apenas causa decréscimo significativo da viabilidade celular após 180 min. Ao se analisar o efeito das concentrações médias de  $0,014$ ,  $0,017$  e  $0,019 \text{ mg.mL}^{-1}$  de DOX após o mesmo período de 180 min, os decréscimos foram bastante superiores: 39, 41 e 43%, respectivamente. As maiores quedas de viabilidade, porém, foram observadas para as concentrações de  $0,022$  e  $0,025 \text{ mg.mL}^{-1}$ : 74% e 86%, respectivamente.

A partir das informações geradas na Figura 39A, foi possível traçar o perfil cinético da ação que cada uma das concentrações de DOX exerce sobre as células ao longo do tempo (Figura 39C), bem como as correspondentes quedas da fração de células viáveis em função da concentração de DOX após 180 min (Figura 39D).



**Figura 39:** Perfil do crescimento celular nas câmaras de cultivo ao longo do tempo: (A) Perfil do comportamento celular frente a diferentes concentrações de DOX ao longo de 180 min; (B) Perfil do número de células obtido na ausência de DOX (controle); (C) Perfil da cinética celular nas diferentes concentrações de DOX em função do tempo; (D) Perfil da queda da viabilidade celular após 180 min, em função da concentração de DOX. As células foram contadas em cada quadrante, e as análises foram realizadas em triplicata. FONTE: Vit et al (2021). Imagem reproduzida sob a autorização da Elsevier.

O perfil apresentado na Figura 39 A corrobora as imagens apresentadas na Figura 39C, nas quais é possível verificar visualmente a diminuição do número de células com o aumento da concentração de DOX. Além disso, é possível verificar a ação cinética da DOX sobre a viabilidade celular. Mesmo concentrações menores de DOX, já causam a redução do número de células viáveis ao longo do tempo (Figura 39B). Além disso, o tempo exposição das células ao fármaco, diminui a viabilidade celular. A queda da viabilidade celular apresenta um perfil linear e inversamente proporcional ao aumento de concentração de DOX (Figura 39C).

Com os dados obtidos foi possível estimar a concentração mínima de fármaco capaz de resultar em queda de 50% da viabilidade celular ( $IC_{50}$ ) no tempo de 180 min. Para isso, foi utilizado um ajuste exponencial linear, e por meio da equação gerada por esse ajuste foi obtido o  $IC_{50}$  de  $0,022 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  (ANEXO II). Dado esse, que corrobora com os resultados apresentados na Figura 39A.

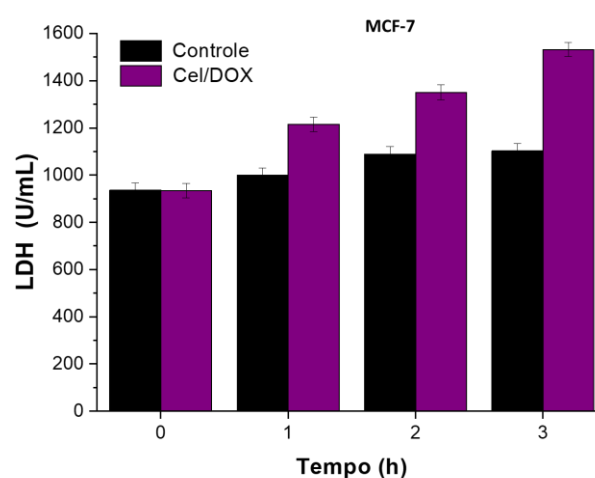
A avaliação das células viáveis ao longo do tempo foi possível no microdispositivo devido à utilização de um sistema de escoamento contínuo, que mantém uniformes as concentrações de DOX tanto na corrente de entrada ( $0,025 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) quanto dentro das câmaras de cultivo. Sendo assim, as células são efetivamente submetidas a concentrações de fármaco constantes ao longo de todo o período de ensaio. O ensaio dinâmico também possibilita que a interação entre o fármaco e as células ocorra de forma mais estável, sendo o único limitante a taxa de difusão de DOX do meio para o interior da membrana celular. Vantagens essas, que não são observadas nos ensaios convencionais em placas, que ocorrem de forma estática, e as células estão submersas a uma determinada concentração do fármaco. Nesses casos, essa concentração de fármaco, pode ser consumida e variar ao longo do tempo. Assim, os ensaios utilizando microfluídica são mais precisos para avaliar o tempo e a concentração necessárias para que um determinado fármaco tenha uma ação eficaz nas células animais.

É interessante comparar estes resultados com os obtidos previamente por outras metodologias. Deschamps et al. (2017), por exemplo, realizaram estudos *in vivo*, utilizando coelhos como modelo de câncer de fígado. Os autores realizaram administração de DOX ( $5 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) por infusão intra arterial e, após 5 minutos, foi observado que a concentração plasmática de DOX era de apenas  $0,42 \text{ mg.mL}^{-1}$ . Esta concentração diminuiu drasticamente após 10 minutos e se estabilizou a partir de 15 min, mostrando que, os ensaios tradicionais estão sujeitos a um considerável caráter transiente da quantidade de fármaco dissolvido. Os autores observaram fatores indesejados, como quanto maior a concentração de DOX ministrada, maior o acúmulo do fármaco em tecidos saudáveis do fígado, o que pode se tornar tóxico para as células (DESCHAMPS et al., 2017).

Nesse caso, a concentração plasmática encontrada pelos autores é cerca de 20 vezes superior à a que utilizamos no microchip para encontrar o efeito de diminuição da viabilidade celular ao longo do tempo. Esta diferença pode ser consequência do próprio sistema *in vivo*, no qual existe maior limitação para a entrega do fármaco e diferentes rotas possíveis de degradação. Estes fatores acabam aumentando as concentrações de um fármaco, para que o fármaco seja distribuído para os tecidos e apenas se difunda para o interior das células. Em nosso caso, a análise envolve apenas as células, possibilitando

identificar o efeito de redução de células viáveis com concentrações menores de DOX e durante um tempo maior de análise. Essa informação, pode contribuir para o entendimento dos reais mecanismo e da concentração de fármaco à qual as células devem ser expostas. Isto se soma aos conhecimentos *in vivo* para estabelecer uma dosagem apropriada, evitando possível acúmulo de fármacos em tecidos saudáveis (GAO et al., 2017).

Outra metodologia importante de avaliação do efeito da DOX nas células é a avaliação da quantidade de lactato desidrogenase livre (LDH). O LDH possui um papel de de sinalizador tumoral, pois reduz o piruvato a lactato, produzindo  $\text{NAD}^+$ . O  $\text{NAD}^+$  é essencial à via glicolítica, pois fornece às células o oxigênio necessário às suas atividades metabólicas (PELIZZARI et al., 2019). Assim, à medida que as células sofrem a ação da DOX, é esperado que ocorra um aumento da geração de LDH, como pode ser verificado na Figura 40.



**Figura 40:**Concentração da enzima lactato desidrogenase ao longo de 3 h. O ensaio foi conduzido por meio de uma reação enzimática que quantifica a presença desta enzima no meio. As barras em preto representam o controle (branco), no qual as células não passaram por nenhum tratamento, e as barras em roxo representam as células após do tratamento com a DOX. FONTE: Vit et al (2021). Imagem reproduzida sob a autorização da Elsevier.

Para a realização do ensaio de LDH, foram coletadas amostras do meio de cultivo durante 3 horas (coletas feitas em cada saída do microchip, em intervalos de 1 h). Os resultados apresentados na Figura 40 mostram uma análise combinada de todas as

concentrações, e servem como forma indireta da avaliação da ação do fármaco sobre as células.

Para comparação, também foi avaliada a concentração de LDH (controle) nas células tumorais MCF-7 sem tratamento com DOX) Na Figura 40 é possível verificar que no instante inicial ( $t=0$ ), a quantidade de enzima presente no meio é idêntica para o controle e para as células tratadas. No entanto, após 1, 2 e 3 h notam-se sucessivos aumentos percentuais da concentração LDH quando comparada ao seu valor inicial: 30, 44 e 60%, respectivamente como pode ser observado na Tabela 2.

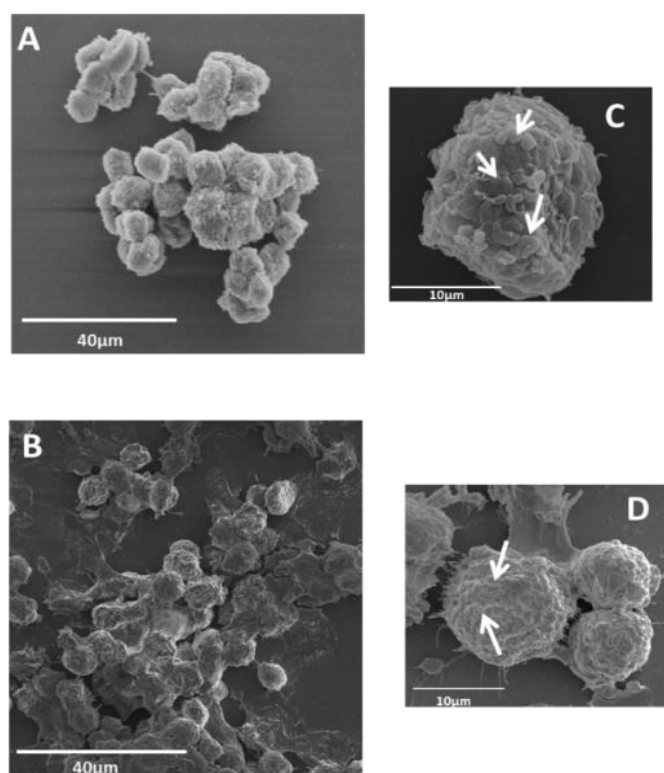
**Tabela 2:** Concentração de *lactato desidrogenase* (LDH) liberado ao longo de 3 h. A liberação de LDH foi observada nas células tratadas com DOX e das células em tratamento.

| <i>Liberação de lactato desidrogenase (LDH- U/mL)</i> |                                 |                                        |
|-------------------------------------------------------|---------------------------------|----------------------------------------|
| <i>Tempo (h)</i>                                      | <i>Células tratadas com DOX</i> | <i>Células não tratadas (controle)</i> |
| 0                                                     | 934 $\pm$ 30                    | 936 $\pm$ 30                           |
| 1                                                     | 1215 $\pm$ 31                   | 1000 $\pm$ 30                          |
| 2                                                     | 1350 $\pm$ 32                   | 1089 $\pm$ 31                          |
| 3                                                     | 1532 $\pm$ 30                   | 1103 $\pm$ 32                          |

Nas células não tratadas (controle), o aumento para os mesmos instantes de tempo foi de apenas 6, 16 e finalmente 17 %. A quantidade de LDH livre é cerca de 25 vezes maior para as células tratadas com DOX do que observado para as não tratadas (controle). Mais uma vez, isto é consequência da ação antitumoral da DOX, o qual atua diretamente no DNA das células tumorais e leva à sua apoptose, liberando uma grande quantidade de LDH para o meio externo (BURRIDGE et al., 2016; YAO et al., 2017; DAS et al., 2019). O estudo de LDH não apenas serve de indicador da progressão do tumor e da eficácia do fármaco sobre as células, mas também auxilia na escolha de uma concentração adequada e no tempo de administração de um fármaco, para que ocorra a regressão do tumor.

#### 4.2.6 Análise morfológica das células e a utilização da reversibilidade do dispositivo microfluídico

Com o intuito de demonstrar o potencial da reversibilidade do microdispositivo (Figura 41), e concomitantemente analisar a morfologia das células cultivadas nele, foi avaliada por MEV a morfologia com e sem o tratamento com a DOX. Para essa análise as células foram cultivadas por 180 min, tanto na presença quanto na ausência de DOX. No caso de tratamento com DOX, foi aplicada a concentração de entrada de  $0,025 \text{ mg. mL}^{-1}$ .



**Figura 41:** (A) Imagem das células presentes nas câmaras de cultivo sem o tratamento com DOX (controle). Escala =  $40 \mu\text{m}$ . (B) Células tratadas com  $0,025 \text{ mg. mL}^{-1}$  de DOX durante 180 min (C) Ampliação da célula sem tratamento. Barra de escala =  $5 \mu\text{m}$ . (D) Ampliação da célula tratada com DOX ( $0,025 \text{ mg. mL}^{-1}$ ) após 180 min. Barra de escala =  $10 \mu\text{m}$ . As flechas em branco, representam as microvilosidades presentes nas células. FONTE: Vit et al (2021). Imagem reproduzida sob a autorização da Elsevier.

Na Figura 41A, é possível observar que as células sem tratamento estão fortemente aderidas entre si e que apresentam microvilosidades abundantes (Figura 41C- flechas em branco). Enquanto isso, nota-se que as células que foram tratadas com DOX

apresentaram pouca adesão célula-célula (Figura 41B), e que também ocorreu redução de tamanho de algumas células e das suas microvilosidades superficiais (Figura 41D) (VISAGIE; BIRKHOLTZ; JOUBERT, 2014; WANG; TIAN; AN, 2016).

As mudanças morfológicas observadas nas células tratadas com DOX são características de apoptose (HACKER, 2000). A doxorubicina é um agente quimioterápico da classe das antraciclinas, nas quais o principal mecanismo de ação depende a capacidade de interagir e intercalar com a dupla hélice do DNA, e interromper a síntese de ácidos nucleicos. Esta intercalação inibe as funções do DNA e das polimerases de RNA (funções de replicação de DNA e de transcrição de RNA), o que resulta em efeito citotóxico significativo nas células durante fase de divisão celular e induz o processo de apoptose (ARMSTRONG; DASS, 2018).

A análise morfológica por microscopia eletrônica de varredura permitiu a observar a morfologia celular sem uso de marcadores, possível devido ao selamento reversível do microdispositivo. Em micropositivos convencionais a morfologia só pode ser observada com marcadores, para análise de MEV, só é possibilitado cortando o microdispositivo, o que pode danificar a amostra. Um exemplo que mostra claramente os problemas intrínsecos ao trabalho com sistemas microfluídicos selados é o isolamento de RNA. Apesar de ser uma técnica bem estabelecida em dispositivos microfluídicos convencionais, requer uma série de análises de difícil execução. Perdas de amostras são comuns principalmente durante a coleta, e parte das amostras é retida em volumes mortos (NAN; JIANG; WEI, 2014; SONG et al., 2018).

Uma alternativa para reduzir essas perdas é a utilização de membranas específicas para RNA. Porém, vedações tradicionais como plasma de oxigênio não permitem a vedação entre o polímero e o material usado na fabricação das membranas, causando vazamentos. Dessa forma, são necessárias plataformas mais fáceis de operar e que exigem pouco consumo de reagentes (ABHYANKAR et al., 2016).

O PDMS<sub>LAM</sub>, de uma forma geral, consegue resolver uma série de desafios devido ao seu processo de fabricação. O material permite a adesão ao vidro sem vedação por plasma, modificação química de superfície ou uso de adesivos, e também apresenta adesão em superfícies de vidro tratadas com matrizes extracelulares ou proteínas. Outra

vantagem do microdispositivo proposto, uma vez que a selagem é reversível, é fácil descoplar as camadas (desmontar) e retirar o material biológico sem danificar ou perder o mesmo. Esse fator possibilita a realização de análises futuras que exijam recuperar as células para ensaios biológicos mais complexos.

Além disso, devido ao material utilizado o microdispositivo pode ser reutilizado, uma vez que pode ser esterilizado e exposto a temperatura relativamente alta sem alterar suas características químicas e morfológicas do material.

#### **4.4 Conclusão**

O microdispositivo projetado possibilita realizar replicatas em um único ensaio, uma vez que possui 6 câmaras de cultivo por módulo. Além disso, presença de quatro módulos, permite também realizar diferentes testes em um único experimento, sem problemas de contaminação cruzada (permeação do fármaco por meio do material utilizado para construção do microdispositivo, de um módulo para outro módulo), uma vez que o comportamento do controle (células sem fármaco) não sofreu alteração na sua viabilidade.

Embora a viabilidade celular em poços e nas câmaras de cultivo não sejam idênticas para os tempos de 48 e 72h, os ensaios de *drug screening*, de foram realizados em menos de 24h (~ 10 h). Um dos fatores para que isso ocorra pode ser a configuração das células no microdispositivo e nas placas e a possível evaporação do meio de cultivo nas microcâmaras.

Quanto a configuração as células, mesmo utilizando como base das câmaras de cultivo o vidro, esse vidro foi tratado com uma solução de poli-L-lisina, que aumenta a aderência das células no vidro, muito similar a adesão das células em placas e garrafas, mesmo assim vale aqui ressaltar que as células estão imersas em uma matriz extracelular, ou seja, as células não estão em contato direto com o vidro.

No caso da evaporação do meio de cultivo, a quantidade de volume de meio nas câmaras pode ser uma limitação para cultivos longos. Como uma alternativa para evitar esse tipo de problema, seria trocar o meio a cada 12 h, ou criar micro-reservatórios acoplados nas entradas dos canais, provendo assim meio de cultivo constante para as

células. No entanto, no intervalo de tempo em que foram realizados os experimentos (menos de 24h), a viabilidade celular nos poços e nas câmaras de cultivo são comparáveis.

O microdispositivo também permite a operação utilizando um gradiente de concentração de difusão linear, que possibilita avaliar o comportamento celular em diferentes concentrações do fármaco. Embora o gradiente de fármaco gerado no microdispositivo seja muito diferente do gradiente que ocorre em sistema fisiológicos onde deve ser levado em consideração a meia vida do fármaco, o microdispositivo pode obter respostas satisfatórias para o observar o comportamento de tecidos retirados de biópsias (análise local) e/ou células extraídas diretamente de pacientes em diferentes concentrações de fármaco, auxiliando na escolha do tratamento adequado.

Além disso, foi possível utilizar os quatro módulos em paralelo para observar o comportamento da célula sob um gradiente de concentração do fármaco e o controle simultaneamente. A selagem reversível do microdispositivo e a adesão do PDMS<sub>LAM</sub> ao vidro provaram ser uma alternativa viável para a recuperação das células para assim, efetuar análises mais complexas.

O PDMS<sub>LAM</sub> não interfere no crescimento celular e pode ser reutilizado sem perder suas propriedades adesivas (PDMS/vidro), o que diminui os gastos e o tempo com a fabricação de microdispositivos, visto que a técnica de ablação com laser CO<sub>2</sub> e/ou xurografia são técnicas reprodutíveis e rápidas. O microdispositivo modular e de selagem reversível pode ser uma ferramenta poderosa para estudar o comportamento celular na presença de diferentes concentrações de fármaco, avaliando o comportamento celular de forma dinâmica.

Além disso, comparando com a macro escala, o microdispositivo possibilita reduzir os custos anuais com amostras e reagentes em aproximadamente 90%, uma vez que o volume utilizado é na faixa de microlitros.

---

## Capítulo 5- Sistema *On a chip* para avaliar simultaneamente a dose responsiva de dois quimioterápicos em cultivo 3D.

---

### Resumo

Um dos principais tratamentos para diversos tipos de tumores é a quimioterapia, que consiste na administração de uma série de medicamentos para diminuir as células tumorais presente no organismo. No entanto, apesar de se ter um tratamento consolidado, um dos efeitos adversos é o fenômeno conhecido como *Multidrug Resistance* (MDR), onde as células “expulsam” o medicamento para fora do ambiente intracelular. Para evitar esse fenômeno, diversas estratégias são utilizadas, entre elas a utilização de dois ou mais medicamentos em concentrações baixas, com o intuito de aumentar a sensibilidade das células ao tratamento. O presente trabalho, apresenta uma alternativa eficaz para testar dois medicamentos simultaneamente. Para esse estudo foi utilizado o microdispositivo desenvolvido em nosso grupo de pesquisa, que permite gerar 6 concentrações simultâneas de cada um dos fármacos, além dos fármacos doxorrubicina (DOX) e paclitaxel (PXT). Foi novamente utilizada a linhagem MCF-7 (Michigan Cancer Foundation-célula de câncer de mama) submersas em matriz extracelular (Matrigel®) e agarose. Os fármacos foram testados de forma individual e combinada. O experimento teve duração de 180 min, testando 3 condições distintas (C1= 0,010 DOX e PXT 0,002; C2=0,010 e PXT 0,004; C3=0,011 DOX e PXT 0,004) variando a concentração e entrada dos fármacos. As concentrações intermediárias geradas a partir das concentrações de entrada foram mais eficientes no teste combinado, diminuindo o tempo para o decréscimo das células tumorais (C1=180, C2=120 e C3=90 min), não sendo relatado isso nos testes com os fármacos isolados. Dessa forma, o microdispositivo é uma ferramenta que permite estimar por meio da observação do comportamento celular, diferentes combinações de medicamentos de forma simples e rápida.

**Palavras-chaves:** microfluídica, MDR, drug screening, células 3D.

## 5.1 Introdução

O câncer é responsável por cerca de 1 em cada 6 mortes em todo o mundo (INCA, 2019; BUKOWSKI; KCIUK; KONTEK, 2020), dentre os principais tipos de tumores, os tumores de mama, de pulmão, de pele e de próstata, são os mais comuns (NATIONAL CANCER INSTITUTION, 2015; FERLAY et al., 2019). Um dos principais procedimentos é a retirada cirúrgica do tumor, sendo necessário tratamentos complementares. Os tratamentos complementares podem ser a radioterapia, onde é aplicada radiações ionizantes (raio X, por exemplo) para destruir um tumor ou impedir que suas células aumentem, e a quimioterapia que consiste na administração de uma série de medicamentos para diminuir as células tumorais presente no organismo (RODRÍGUEZ-CABALLERO et al., 2012; STOUT et al., 2017; WAKS; WINER, 2019).

No caso da quimioterapia, apesar de ser um tratamento bastante consolidado, muitas vezes pode ocorrer a resistência do paciente ao medicamento e nessa situação, o quimioterápico não tem a ação esperada. Esse fenômeno é conhecido como *Multidrug Resistance* (MDR) (NOOTER; HERWEIJER, 1991; LIN et al., 2018a; LIMERES et al., 2019; CARVALHO et al., 2020). O MDR pode estar associado a diversos fatores como: aumento do efluxo do medicamento (mecanismo interno celular, que ocorre quando a concentração do fármaco é elevada e a célula expulsa o medicamento), fatores genéticos (mutações genéticas, amplificações e alterações epigenéticas), fatores de crescimento, aumento da capacidade de reparo do DNA e metabolismo elevado de xenobióticos (EFFERTH; VOLM, 2017; LI et al., 2017; OMRAN et al., 2020; PARIS; ANGELI; BOUSQUET, 2021; ZHANG et al., 2021).

Uma das formas de diminuir os efeitos de MDR, é a administração combinada de dois ou mais fármacos. A co-administração de mais de um fármaco já vem sendo utilizada, para evitar o efeito de resistência celular ao fármaco e também a diminuição da citotoxicidade em tecidos normais. O sucesso da co-administração deve-se as baixas concentrações de fármacos quando comparada as concentrações utilizadas dos fármacos individualmente (QI et al., 2017; WU et al., 2017; ZHU et al., 2017; FENG et al., 2019). No entanto, testes para avaliar a concentração ideal de cada um dos fármacos são exaustivos e nem sempre representam o real efeito combinado. Além disso, a alta

dosagem de medicamentos como quimioterápicos, pode causar efeitos citotóxicos, em tecidos cardíaco, pulmonar e hepático (KALININ et al., 2009; LI et al., 2015; SZETO et al., 2015; TRAN et al., 2017; SENAPATI et al., 2018; HIREMATH et al., 2019) e a combinação de quimioterápicos oferece a possibilidade de redução da dosagem na administração nos pacientes.

Nesse contexto, dispositivos microfluídicos que permitam explorar diferentes concentrações de fármacos e/ou reagentes de forma simultânea, por meio de geradores de gradiente de concentração, são uma ferramentas poderosas para *screening* de fármacos (KOTHAPALLI et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2016a; WANG; LIU; PANG, 2017; ZHAO; GE; YANG, 2017; VIT et al., 2018).

As diferentes concentrações geradas em dispositivos microfluídicos, permitem explorar diferentes concentrações em único ensaio, sendo menos laboriosos que os ensaios tradicionais (em placas) (MULHOLLAND et al., 2018; SHEN et al., 2019) e permitindo a aquisição de muitas informações no mesmo tempo de avaliação.

Atualmente, muitos trabalhos utilizam gradientes de concentração para realizar ensaios com dois ou mais fármacos de forma dinâmica sendo observado a resposta celular (dose responsiva) em tempo real (LIM; PARK, 2018; RISMANIAN; SAIDI; KASHANINEJAD, 2020). No entanto, os ensaios de dois ou mais fármacos não são realizados simultaneamente e exigem dispositivos com alto grau de complexidades, envolvendo o emprego de válvulas, por exemplo, o que torna o microdispositivo difícil de ser operado (EDUATI et al., 2018).

Nesse contexto, neste Capítulo apresenta um estudo mais complexo da utilização do gradiente de concentração, como uma alternativa simples para o estudo simultâneo do efeito combinado de fármacos. Para isso, foi utilizado o microdispositivo reutilizável e com selagem reversível desenvolvido anteriormente, avaliando o comportamento celular em diferentes concentrações de fármacos, na forma isolada ou combinada. Vale ressaltar, que na literatura não há estudos até o presente momento que utilizam dois fármacos de forma simples, simultânea e em tempo real. Dessa forma, foi possível avaliar de forma simultânea o efeito de dois quimioterápicos (doxorrubicina e paclitaxel) de forma individual e combinada em células tumorais de mama (Michigan Cancer Foundation-

MCF-7). Essa técnica mostrou-se importante para a identificação do comportamento celular na presença destes quimioterápicos, apresentando-se como uma alternativa simples para a medicina personalizada pois permite encontrar concentrações de fármacos adequadas para minimizar o efeito MDR e a citotoxicidade nos tecidos não tumorais.

## 5.2 Resultados e Discussão

Primeiramente, nesse Capítulo foram efetuadas algumas mudanças operacionais relacionadas à diminuição do número de células, adição de Matrigel® com agarose foram realizadas e desta forma tornou-se necessária a reavaliação do funcionamento completo do microdispositivo. Assim pode-se avaliar sobre o comportamento celular, observando se a cinética de morte celular na presença de DOX sem e com a aplicação de gradiente de concentração. Além disso, pode-se também avaliar o comportamento celular na presença de gradiente duplo de concentração

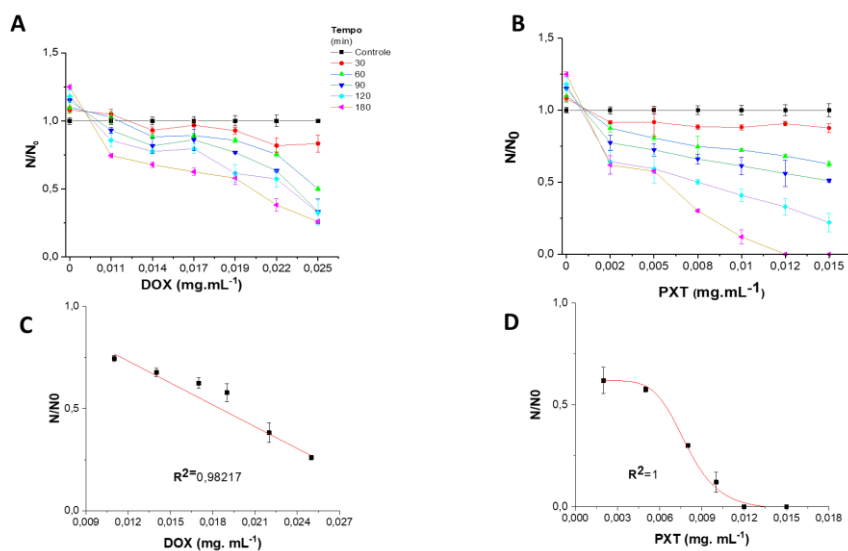
### 5.2.1 Viabilidade celular na presença dos fármacos (PXT e DOX)

A fim de avaliar o comportamento de morte celular de cada fármaco, realizou-se inicialmente o estudo da viabilidade celular no microdispositivo, sem a aplicação de gradiente de concentração. Neste caso, optou-se por não aplicar o gradiente de concentração, inicialmente para verificar se haveria mudança nos valores do  $IC_{50}$  sem a geração do gradiente de concentração, uma vez que foram realizadas alterações de processo (diminuição do número de células e a adição da agarose). Assim, o cultivo das células MCF-7 foi realizado em microdispositivos nesta nova condição.

A escolha das concentrações de entrada de DOX, foi baseada nos resultados prévios (capítulo anterior). Para a escolha da concentração inicial de PXT, foi realizado um *screening* prévio em cultivo convencional (placas-ANEXO III), testando algumas concentrações. Neste último caso, a partir do comportamento apresentado em placas foi escolhida uma concentração inicial do PXT.

Vale ressaltar que o valor da concentração escolhida de PXT, foi da mesma ordem de grandeza das concentrações de DOX testadas. Uma vez escolhidas as concentrações de entrada para cada um dos fármacos ( $DOX=0,025 \text{ mg. mL}^{-1}$  e  $PXT=0,015 \text{ mg. mL}^{-1}$ ), foram avaliadas 5 concentrações intermediárias. Para isso, a configuração do microdispositivo utilizou a mesma solução de DOX ou PXT na

entrada, sem variações de concentrações. Os resultados podem ser observados na Figura 42.



**Figura 42:** Perfil da viabilidade celular na presença dos fármacos doxorrubicina e paclitaxel em microdispositivo (normalizado pelo número inicial  $N_0$ ) para diferentes tempos. Foram testados em microdispositivos os fármacos doxorrubicina (DOX) + o controle (células sem a presença de fármaco) (A) e paclitaxel (PXT+ controle) (B). As análises foram realizadas em triplicatas, sem a geração de gradiente de concentração. Perfil da queda da viabilidade celular após 180 min em função da concentração dos fármacos: (C) DOX e (D) PXT. Para todos os ensaios, foi utilizado o marcador *Live and Dead*, as células foram suplementadas com meio RPMI, incubadas na temperatura de  $37^\circ\text{C}$ , em atmosfera controlada contendo 5 % de  $\text{CO}_2$ . Para todas as análises foram realizadas análise estatística ANOVA com um intervalo de confiança de  $P < 0,05$ .

Para avaliar a viabilidade celular ( $N/N_0$ ); o número de células foi normalizado dividindo o número de células presentes em cada tempos (t), pelo número inicial de células (t=0). Esse processo foi realizado para todas as concentrações testadas

Observando de forma geral, para cada concentração dos fármacos testados, há uma queda da viabilidade celular, sendo que no tempo inicial (t=0) não há efeito de morte celular. O controle (células sem fármaco), não possui alteração considerável no número de células, demonstrando que o efeito da queda da viabilidade de células viáveis é ocasionado apenas pela ação dos fármacos testados.

Por meio do ajuste apresentados nas Figuras 42 C e 42 D foi possível estimar a dosagem de DOX e PXT para inibir 50% das células ( $IC_{50}$ ). A dosagem de DOX foi de aproximadamente de  $0,022 \text{ mg.mL}^{-1}$  e de PXT foi de  $0,008 \text{ mg.mL}^{-1}$  (ANEXO III).

No caso da DOX, o  $IC_{50}$  anteriormente (Capítulo 4) foi também de  $0,022 \text{ mg.mL}^{-1}$ , mesmo em condições operacionais diferentes (número de células mais elevados  $\sim 600$  células por microcâmara, sem utilizar marcadores para análise da viabilidade e sem agarose). Dessa forma, é possível afirmar que, o valor  $IC_{50}$  não modificado nas condições atuais.

Além disso, a nível celular os resultados obtidos a partir das concentrações de entrada de DOX e PXT *in vitro*, ficam muito próximos aos resultados obtidos em sistemas fisiológicos reais. O estudo de Lengyel et al (2015), para verificar a o aumento das células tumorais ao fármaco PXT, da forma individual e juntamente com o fármaco metformina. Para o estudo, os autores utilizaram camundongos geneticamente modificados com câncer de ovários, foi observado que a dose intravenosa de PXT (sem metformina) para obter o  $IC_{50}$  foi de aproximadamente de  $0,0092 \text{ mg.mL}^{-1}$ , muito próximo do valor obtido em microdispositivo ( $0,008 \text{ mg.mL}^{-1}$ ). O mesmo ensaio realizado em placas, utilizando células de ovários humanos (HeyA8 OvCa), o  $IC_{50}$  foi equivalente a  $0,01 \text{ mg.mL}^{-1}$ , ou seja, aproximadamente 10X maior que o  $IC_{50}$  obtido em microdispositivo.

No caso do fármaco DOX, Deschamps et al., (2017) observaram em estudo utilizando coelhos com câncer de fígado, que a concentração plasmática de DOX foi de  $0,42 \text{ mg.mL}^{-1}$ , sendo que essa concentração decaiu após 10 minutos de infusão, estabilizando apenas após de 15 min ( $0,32 \text{ mg.mL}^{-1}$ ). Os resultados obtido em microdispositivo ( $0,022 \text{ mg.mL}^{-1}$ ), quando comparados em resultados em placas ( $\sim 22,2 \text{ mg.mL}^{-1}$ ), são mais similares. Vale ressaltar, que altas concentrações de fármacos, principalmente quimioterápicos, podem acumular em tecidos saudáveis, provocando efeitos citotóxicos ao organismo.

### 5.2.2 Verificação do fármaco como efeito predominante da morte celular

A utilização de microdispositivos para observar o comportamento celular tem uma série de vantagens quando comparado a macro escala. Uma das vantagens é a criação de microambientes que proporcionam a mimetização de ambientes fisiológicos. Desta

forma, torna-se possível observar fenômenos que não seriam possíveis de observar em macroescala.

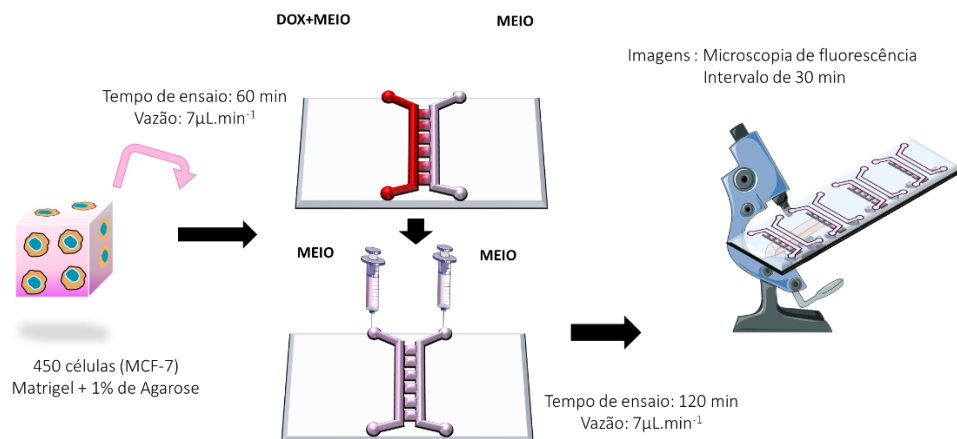
No caso de microdispositivos para *drug screening*, é imprescindível, garantir que os fenômenos que ocorrem nesses microambientes, sejam predominantemente oriundos do princípio de ação do fármaco testado, fornecendo resultados confiáveis.

De uma forma geral, para garantir que é o efeito do fármaco que atua o processo de senescência celular, diversos trabalhos, utilizam microchips projetados para ter câmaras de cultivo distintas, conde cada uma possui uma concentração distinta e de forma separada, o que evitaria por exemplo, possível comunicação celular das células em uma concentração para outra concentração (ZHAI et al., 2019; ZHANG et al., 2016).

Neste trabalho, o gradiente difusivo de concentração de DOX é gerado dentro da câmara de cultivo e devido a isso, alguns protocolos foram adotados para evitar uma possível comunicação celular como: a diminuição do número de células por câmaras (~450 células) e utilizando agarose 1% (m/v) para evitar o contato célula-célula.

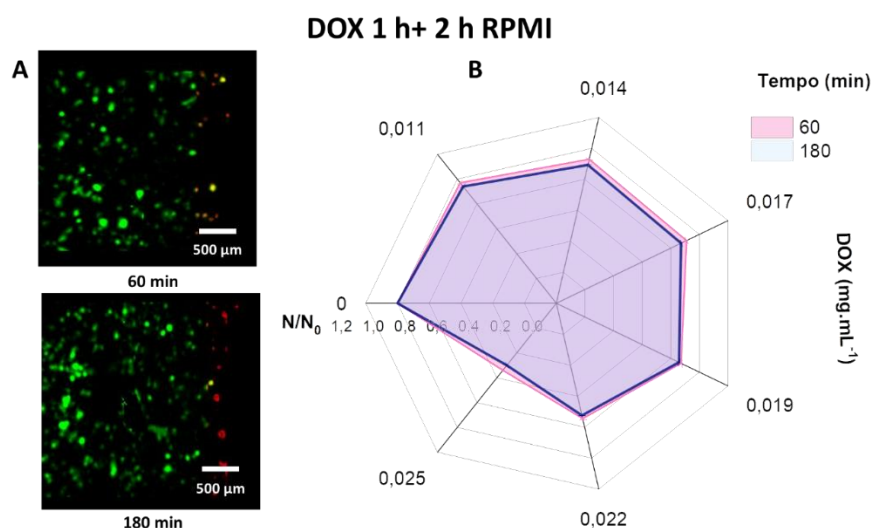
Apesar disso, a fim de verificar se a morte celular ocorre prioritariamente pela presença do fármaco, que está distribuído na microcâmara por meio de um gradiente de concentração, avaliamos a operação do microchip de forma diferenciada.

Na condição experimental testada, antes da geração do gradiente de concentração de PXT, foi repetido o gradiente de concentração de DOX na presença das células. Desta forma, realizamos um experimento que consistiu em escoar DOX diluída em meio RPMI (0,025 mg.mL<sup>-1</sup>) numa vazão de 7 µL.min<sup>-1</sup> em uma das entradas e apenas RPMI em outra entrada por 60 min. Após esse período, foi interrompido o suplemento de DOX e iniciado a suplementação apenas com RPMI.



**Figura 43:** Esquema do ensaio de morte celular ocasionada pelo fármaco (DOX). As células foram inoculadas manualmente nas câmaras de cultivo (450 células) juntamente com Matrigel®+agarose, para minimizar o contato célula-célula. Após a polimerização do gel (cerca de 4 h), foi gerado o gradiente de DOX, como já realizado nos ensaios anteriores, no entanto após 60 min, foi interrompido o suprimento de DOX e o restante do tempo (120min) foi apenas bombeado meio de cultivo (RPMI). Foram obtidas imagens ao longo do ensaio (180 min) a cada 30 min, em microscopia automatizada de fluorescência.

Assim, pode-se observar o comportamento celular ao longo de 120 min adicionais sem a presença da DOX e verificar se houve a propagação do processo de senescência após 60 min. Como controle, utilizamos o protocolo já estabelecido, de manter o gradiente de concentração por 180 min. Em ambos os casos, as células foram marcadas com *Live and Dead* antes do experimento e obtidas imagens a cada 30 min. Os resultados podem ser observados na Figura 44.



**Figura 44:** Efeito da interrupção de DOX dentro das microcâmaras; (A) Células suplementadas com DOX por apenas 60 min. Após 60 min, suspendeu-se o tratamento com DOX e as células foram suplementadas apenas com meio RPMI por 120 min. Imagem nos tempos 60 min e 180 min. (B) Perfil da viabilidade celular nos tempos 60 min e 180 min, ANOVA com  $p > 0,05$ . As células foram mantidas na temperatura de 37°C ao longo do experimento (180 min).

Como pode ser observado na Figura 44A e 44B, após 60 min da aplicação do gradiente de concentração, ocorre apenas morte das células expostas nas concentrações elevadas de DOX. Após a interrupção da DOX, pode-se observar que não houve morte celular significativa após 180 min. O ensaio foi realizado em sextuplicatas em três ensaios independentes, a análise estatística (ANOVA  $p < 0,05$  e Tukey), avaliando da viabilidade celular nos tempos de 60 min e 180 min não apresentaram diferenças significativas entre as médias de  $N/N_0$  para cada tempo. Tal fenômeno é muito diferente do que ocorre com a suplementação constante de DOX (durante todo o tempo de 180 min), como pode ser observado na Figura 44A, onde é possível notar a queda significativa da viabilidade celular.

Perante os resultados apresentados, pode-se inferir que o efeito da DOX nas células é o fator predominante que causa a morte celular. Esta avaliação foi essencial para elucidar uma das grandes preocupações desse sistema, que seria uma possível comunicação celular que causaria um efeito adicional na morte celular. O principal questionamento é se as células que estão em uma concentração maior de DOX, liberam algum sinalizador para células em concentrações menores de fármaco, desencadeando um

efeito cascata, levando a senescência celular. Vale ressaltar que para minimizar uma possível comunicação, as células foram inoculadas em uma solução de agarose 1%, que auxilia no isolamento celular, impedindo que as células presentes na vizinhança se comuniquem, diminuindo a sinalização célula-célula (sinalização -parácrina), que ocorre em cultivos tradicionais (placas) (CHENG et al., 2007; ROSEN; ROARTY, 2014; NAOMI HANDLY; PILKO; WOLLMAN, 2015).

Nesse caso, a sinalização seria possível apenas por sinalizadores a distância (sinalização autócrina), onde a molécula sinalizadora é produzida por uma célula sinalizadora que também é a célula-alvo; necessitando percorrer a corrente sanguínea ou nesse caso a matriz para atingir a célula alvo (DOĞANER; YAN; YOUK, 2016; MÜLLER et al., 2016). No entanto, seria necessário um tempo maior de observação do que 180 min para que as moléculas sinalizadoras fossem internalizadas pelas células-alvo e desencadeassem um efeito cascata, ativando a senescência das células vizinhas.

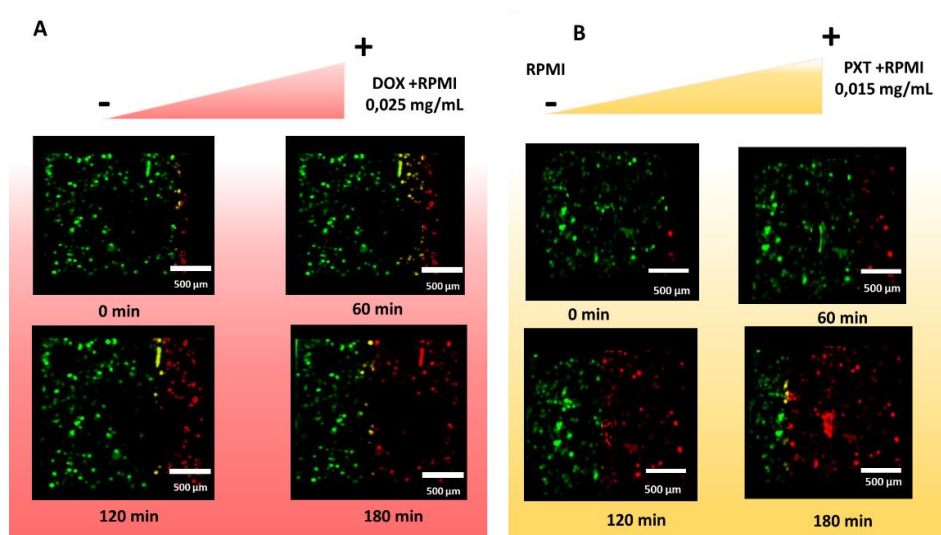
Portanto, nesse período de tempo é possível inferir que o fenômeno predominante que causa a senescência celular é a presença e a própria concentração local e a ação do fármaco, validado o gradiente de concentração nas condições testadas. Nesse caso, para o tempo de ensaio testado (180 min) o gradiente obtém resultados confiáveis nas diferentes concentrações testadas, uma vez que tenha um número de células relativamente baixo por câmara (~450 células), e um agente que minimize o efeito de comunicação (agarose).

Atualmente, não é de nosso conhecimento, estudos sobre validação do efeito do gradiente de concentração em células e em microfluídica.

### **5.2.3 Comportamento celular na presença de gradiente de concentração individual de DOX e PXT**

Nesta segunda etapa, realizou-se a mesma análise anterior, só que utilizando o gradiente de concentração. Neste caso, realizou-se a análise para cada um dos quimioterápicos DOX e PXT, de forma isolada. O objetivo foi de validar se os resultados são comparáveis. Para isso, manteve-se as mesmas condições operacionais (vazão, temperatura e tempo de ensaio) apresentadas previamente no Capítulo 4, para ambos os fármacos.

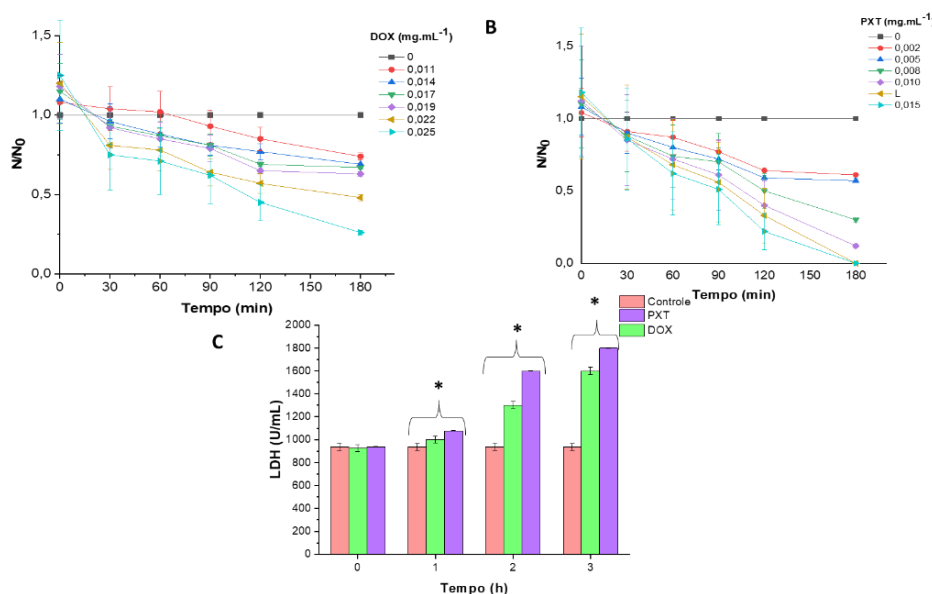
Nesse ensaio, o intuito foi observar os efeitos isolados de cada um dos fármacos (PXT e DOX) em diferentes concentrações e verificar se a concentração para obter o  $IC_{50}$ , sofre modificações com o emprego do gradiente difusivo de concentração. Para facilitar a análise, foi utilizado o marcador de viabilidade (*Live and Dead*), para facilitar a visualização das células viáveis (em verde) e não viáveis (em vermelho). A marcação foi importante para a análise, pois descremina visualmente as células não viáveis das células viáveis. Desta forma, após a marcação das células, as mesmas foram adicionadas nas microcâmaras juntamente com agarose e Matrigel<sup>®</sup>, e após a estabilização da matriz, foi escoado em uma das entradas apenas meio (RPMI) e na outra os fármacos separadamente (DOX e o PXT), diluídos em meio RPMI. As imagens foram obtidas em microscopia de fluorescência, em intervalos de 30 min por 180 min (Figura 45A e B).



**Figura 45:** Microscopias de fluorescência das células MCF-7 nas microcâmaras de cultivo em diferentes tempos e na presença de gradiente de concentração para doxorubicina (A) e paclitaxel (B). Em cada caso, em uma das entradas foi bombeada apenas meio de cultivo (RPMI) e na outra o fármaco (DOX ou PXT) em meio. (A) DOX, concentração em uma das entradas foi  $0,025 \text{ mg.mL}^{-1}$  e (B) PXT, concentração em uma das entradas  $0,015 \text{ mg.mL}^{-1}$ . Utilizou-se cerca de 450 células por câmara de cultivo. O ensaio foi realizado em triplicata por 180 min. Imagens obtidas com objetivas de 20X, barra de escala de  $500 \mu\text{m}$ .

É possível verificar nas Figuras 45A e B a ação do gradiente de concentração ao longo do tempo. É notável, que a diminuição da viabilidade celular, para ambos os fármacos indicada pelas células marcadas em vermelho ao longo de 180 min.

Para quantificar a viabilidade ao longo do tempo para cada concentração obtida, as imagens foram analisadas utilizando uma rotina em MATLAB. A rotina estabelecida, permitiu identificar a ação de cada um dos fármacos na viabilidade celular possibilitando traçar os perfis da viabilidade celular para cada um dos fármacos nos diferentes tempos (Figura 46).



**Figura 46:** Perfil da viabilidade células em diferentes tempos com diferentes concentrações de fármacos (A) PXT e (B) DOX. Para ambos os fármacos, em uma das entradas foi bombeada apenas meio de cultivo (RPMI) e na outra o fármaco diluído em meio. A concentração de células foi de ~450 células por câmara de cultivo. O ensaio foi realizado em triplicata por 180 min. As imagens foram obtidas em microscopia de fluorescência a 37 °C, CO<sub>2</sub> e umidade controlada. (C) perfil da liberação da enzima lactato desidrogenase ao longo de 180 min, onde foram coletadas amostras para cada experimento no intervalo de 60 min (1h).

Na Figura 46A referente ao gradiente de PXT o IC<sub>50</sub> em 180 min, ocorre novamente na concentração de 0,008 mg.mL<sup>-1</sup>. No entanto, já é possível notar a queda significativa da viabilidade no tempo de 120 min e na concentração de 0,010 mg.mL<sup>-1</sup>. No caso do gradiente de concentração de DOX (Figura 46 B), a queda significativa da viabilidade ocorre apenas no tempo de 180 min, onde é alcançado o IC<sub>50</sub> na concentração de 0,022 mg.mL<sup>-1</sup>. Para confirmar os valores de IC<sub>50</sub> para cada um dos fármacos, foi realizada novamente a regressão das curvas no tempo de 180, obtendo o mesmo resultado apontado nos gráficos (ANEXO III).

Os valores de  $IC_{50}$  apresentados para os fármacos DOX e PXT são os mesmos obtidos nos ensaios a geração do gradiente de concentração. No ensaio anterior à concentração para obter o  $IC_{50}$ , no tempo de 180 min foi  $0,008 \text{ mg.mL}^{-1}$  para o PXT e  $0,022 \text{ mg.mL}^{-1}$  para a DOX, demonstrando a confiabilidade da utilização da técnica do gradiente de concentração. No caso da DOX, ainda podemos relacionar esse resultado com o ensaio realizado no Capítulo 4, onde para uma concentração de células maior (600 células por câmaras), a concentração para obter o  $IC_{50}$  também foi de  $0,022 \text{ mg.mL}^{-1}$ . Nesse caso, podemos afirmar que mesmo com uma densidade de célula mais elevada, o gradiente foi alterado, permanecendo linear, uma vez que as condições iniciais (vazão de entrada) não foram modificadas, obtendo assim, mesma concentração inibitória ao final do experimento (180 min). Em termos comparativo, com os testes realizado em placas convencionais, a os não foi possível obter resultados de  $IC_{50}$  nas concentrações testadas e no tempo de ensaio (180 min) para a DOX, e no caso do PXT, o  $IC_{50}$  foi na concentração  $0,1 \text{ mg. mL}^{-1}$ . Isso deve-se ao que foi discutido previamente no Capítulo 4, pela diferença das técnicas, volume e principalmente que no ensaio em microdispositivo não há a limitação de fármacos para as células, ou seja, não há o consumo do fármaco durante o tempo, uma vez que se trata de um sistema dinâmico que sempre entrega a mesma concentração de fármacos ao longo do tempo.

Além disso também foi possível quantificar a enzima *lactato desidrogenase* excretada pelas células em cada um dos tempos (Figura 46C), como forma de verificar indiretamente a eficácia dos fármacos. Vale lembrar que, a liberação desta enzima está indiretamente ligada à eficácia do fármaco, pois as células tumorais produzem em maiores quantidades a enzima lactato para acidificar o meio intracelular, e assim, conseguirem se proliferar. Desta forma, a liberação da enzima lactato serve como um indicador da regressão do tumor. À medida que o fármaco inibe a proliferação celular, ocorre o aumento da enzima lactato, desidrogenase no meio de cultivo.

Na Figura 46C, as amostras foram coletadas nas saídas do microchip em diferentes tempos durante a avaliação da cinética da viabilidade celular (Figura 46 A e B). Em ambos os fármacos a liberação da enzima lactato aumenta ao longo do tempo. Este comportamento é mais acentuado para o PXT, uma vez que há mais morte celular na presença desse fármaco. A análise estatística (ANOVA  $p < 0,05$ ), entre as amostras na

presença de fármaco em relação ao controle apresentaram diferenças estatísticas significativas para ambos os fármacos testados. Além disso, identificou-se diferenças estatísticas significativas entre os comportamentos dos dois fármacos.

Os trabalhos de Dong et al. (2009), Duong & Yung(2013) e Lv et al, (2014) testaram a utilização dos mesmos dois fármacos em análise separadas para obter a diminuição da viabilidade celular. Estes autores observaram que a concentração de DOX para obter o  $IC_{50}$  é maior que a de PXT. A diferença de  $IC_{50}$  está intrinsecamente ligada às características de cada um dos fármacos e seu princípio de ação. Como a DOX age diretamente na síntese de DNA é necessária uma concentração maior para obter o efeito inibitório, diferente do PXT, que necessita de uma concentração menor para polimerizar as tubulinas presentes nos microtúbulos (LIU et al., 2020b).

Uma vez que ocorre a estabilização dos microtúbulos, o processo de mitose celular é inibido e por consequência, impede as células de se proliferarem. Isso explica as diferentes respostas celulares em um mesmo intervalo de tempo.

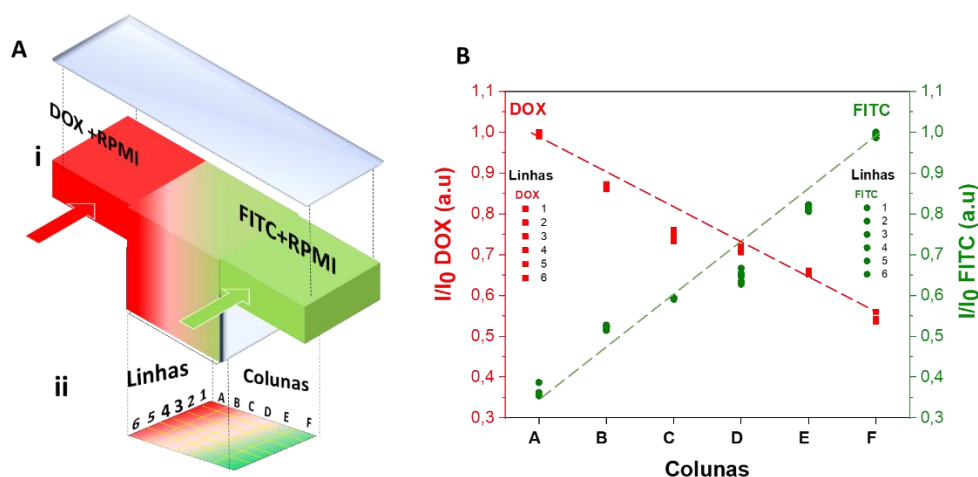
Ao se comparar as estratégias de obtenção do  $IC_{50}$ , pode-se notar que o uso de gradiente de concentração reduz a quantidade de ensaios, uma vez que para cada concentração testada são necessárias replicatas para obter dados confiáveis.

#### **5.2.4 Análise do gradiente de concentração com dois fármacos simultaneamente**

A geração de gradiente de concentração de dois fármacos de forma simultânea é rara. De forma geral, os microdispositivos microfluídicos operam utilizando mais de um fármaco análise combinatória, geralmente escoam um fármaco primeiro, e assim que todas as células entrem em contato com esse fármaco, o mesmo é suspenso e iniciado o escoamento do segundo fármaco e assim por diante. Essa técnica é utilizada para evitar possíveis reações químicas entre os fármacos, desestabilizando o gradiente de concentração. Dispositivos que testam uma gama de fármacos e em diferentes concentrações, geralmente dependem de válvulas e outras técnicas mais complicadas para verifica o efeito dos fármacos (EDUATI et al., 2018; SCHUSTER et al., 2020). Em nosso estudo, propomos avaliar de forma simples um gradiente de concentração difusivo com dois fármacos simultaneamente, para o estudo do efeito sinérgico de dois fármacos nas células.

Assim, para validar se há possibilidade de gerar um gradiente difusivo com dois fármacos de forma simultânea dentro das microcâmaras de cultivo, sem modificar o perfil do gradiente de concentração, foi realizado um ensaio utilizando o fármaco DOX, em uma das entradas do microdispositivo e na outra entrada um fluoróforo (FITC). A escolha do FITC, deve-se primeiramente, por apresentar uma emissão de fluorescência diferente da DOX, e também por facilitar a visualização da formação do gradiente formado por dois reagentes, uma vez que o fármaco PXT não apresenta fluorescência.

O intuito foi verificar a diminuição da intensidade de fluorescência individual de cada um dos compostos, à medida que um se difunde no outro. Para simular de forma mais fidedigna o fármaco PXT, a concentração de entrada de FITC foi a mesma concentração de entrada utilizadas para os ensaios com PXT ( $0,015 \text{ mg.mL}^{-1}$ ). Os ensaios foram realizados em triplicatas e perfil do gradiente formado pode ser observado na Figura 47.



**Figura 47:** Análise do gradiente formado por dois fármacos. Foram utilizados o fármaco DOX ( $0,025 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) e o fluoróforo FITC ( $0,015 \text{ mg.mL}^{-1}$ ), na mesma concentração do fármaco PXT. (A) Diagrama esquemático do gradiente formado dentro das microcâmaras. As microcâmaras foram subdivididas em câmaras virtuais em linhas (1-6) e colunas (A-F).

Na Figura 47 A é possível observar o diagrama esquemático da microcâmara de cultivo, subdivida em linhas (1-6) e colunas (A-F). Para verificar a diminuição da intensidade da fluorescência ao longo da microcâmara, para cada um dos compostos, foi observado as fluorescências isoladas em filtros de emissão de fluorescência adequado

para cada um dos compostos. Foram obtidas imagens nos dois filtros (FITC: emissão em 521 nm e DOX: emissão em 560 nm). Após a aquisição das imagens em cada um dos filtros separados, foi utilizando o software ImageJ, para mensurar as fluorescências de cada composto separado ao longo das microcâmaras. Por fim, as imagens foram sobrepostas e analisadas em conjunto, verificando o somatório das intensidades para cada subárea analisada (análise realizada no Capítulo 4; item 4.2.3).

Na Figura 47B, é possível verificar um comportamento linear de cada um dos compostos. No caso da intensidade média de DOX foi possível verificar que, a medida que o composto percorre a microcâmara de cultivo ele se difunde ao longo da câmara de cultivo; diminuindo a intensidade de fluorescência inicial. Neste caso, a DOX apresenta intensidades de fluorescência maiores que o FITC, uma vez que a concentração de DOX também é maior ( $0,025 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) e a intensidade está diretamente ligada à concentração do composto. Uma vez que, o perfil de concentração é linear, é possível por meio da intensidade de fluorescência, estimar a concentração em cada uma das subáreas virtuais das microcâmaras de cultivo. O mesmo comportamento foi observado para o fluoróforo FITC.

Vale ressaltar, que o comportamento linear, está intrinsicamente relacionado a vazão utilizada, a geometria adotada, a concentração do composto e a difusividade do composto ao meio inserido. No caso das moléculas de DOX, FITC ou mesmo da PXT, por se tratarem de moléculas pequenas e bastante diluídas, elas conseguem difundir ao longo da matriz extracelular, mantendo o perfil linear de concentração (GARCÍA et al., 2015; TANG et al., 2018; PERRODIN; SELLA; THOUIN, 2020).

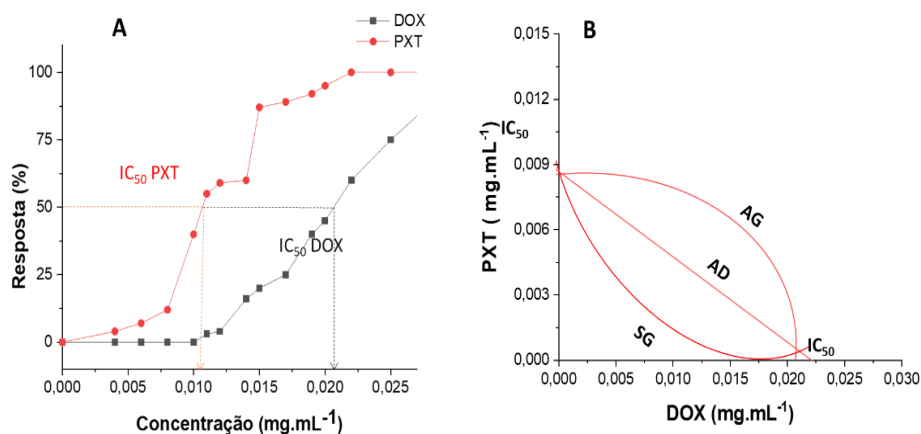
Validado que o perfil do gradiente de concentração utilizando dois fármacos é linear, é possível extrapolar esse comportamento para outros fármacos com mecanismo de ação semelhantes, no entanto é importante verificar que os fármacos a serem testados, não possuam interações químicas entre si (UHL; MUZYKANTOV; LIU, 2018; CHANG et al., 2019).

Após de verificar que não há nenhuma perturbação no gradiente e que o perfil é linear, foi realizada a análise do gradiente de concentração com dois fármacos com a presença de células.

### 5.2.5 Gradiente simultâneo de DOX e PXT na presença de células

A análise das interações medicamentosas, são importantes para compreender se o efeito de dois ou mais fármacos no organismo e/ou nas células de interesse. Os efeitos podem ser compreendidos como efeito sinérgico, quando o princípio de ação dos dois fármacos no organismo ou nas células é maior que a ação isolada de cada um dos fármacos; efeito aditivo, quando o princípio de ação dos dois fármacos é igual a ação isolada de cada um do fármaco ou efeito antagônico, quando um dos fármacos anula o outro fármaco ou causa um efeito adverso no organismo e /ou células(HUANG et al., 2019).

Em suma, é possível prever a concentração necessária de cada um dos fármacos para obter cada um desses efeitos. Para isso, é imprescindível conhecer o efeito das concentrações isoladas de cada um dos fármacos e/ou agentes químicos, e principalmente saber qual é a concentração necessária de cada um dos fármacos que se deseja testar para obter o  $IC_{50}$  (Figura 48A). Assim, é possível construir a representação gráfica dos efeitos isolado para obter o(s) efeito(s) combinado(s) (isoblograma-Figura 48B).



**Figura 48:** (A) Perfil da dose responsiva para obter o  $IC_{50}$  para cada um dos fármacos testados (DOX e PXT) e (B) Representação gráfica dos efeitos combinados (isoblograma) baseado no  $IC_{50}$  de cada um dos fármacos. A área denominada SG, compreende as concentrações de fármaco que quando combinado, possuem o efeito sinérgico, AD, é onde o princípio de ação individual e combinados são os mesmos, efeito aditivo e a área denominada AG, o efeito antagônico, é a área que as concentrações de cada um dos fármacos se anulam ou não surte nenhum efeito.

É imprescindível que seja realizada essa análise preliminar, antes de testar o(s) efeito(s) combinado(s) *in vivo*, para evitar ações adversas, ou mesmo *in vitro* para otimizar o tempo de ensaio. Para os ensaios com os fármacos combinados, além da análise isobolográfica, foi utilizado o software livre SynergyFinder 2.0, que de acordo com as concentrações de  $IC_{50}$  de cada fármaco analisado, ele prediz as concentrações de cada um dos fármacos para obter o efeito sinérgico. Com base nas possíveis concentrações sinérgicas, preditas pelo software, foram realizados 3 ensaios, variando as concentrações de fármacos, de forma que a soma das razões entre as concentrações, fossem menores que 1.

Na Figura 48A, foi traçado novamente o perfil da viabilidade celular nas diferentes concentrações testadas para a DOX e o PXT. Para facilitar o estudo, foram observadas apenas a viabilidade ao final de 180 min, obtidas previamente nas Figuras 46A e B.

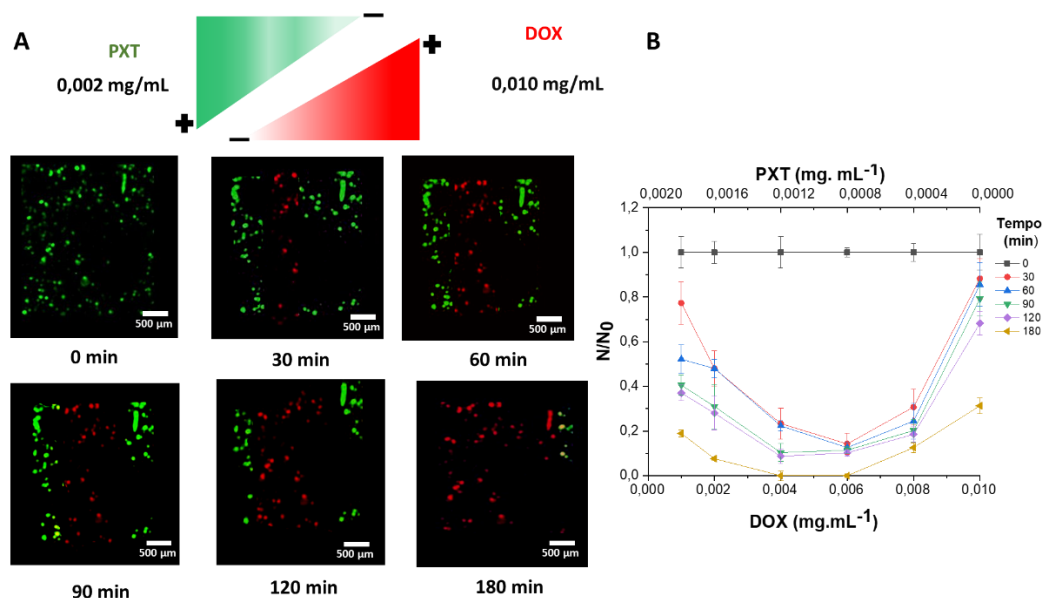
Já o perfil apresentado na Figura 48A, foi baseado nos dados preliminares apresentado na seção 5.2.1, onde foi obtido experimentalmente o  $IC_{50}$  para cada um dos fármacos. A partir dos  $IC_{50}$ , foi possível construir o isoblograma, onde em cada uma das abscissas, foi colocado um dos fármacos com as concentrações testadas e traçado uma reta que interliga os  $IC_{50}$  de cada um do fármaco. Nesta reta é onde ocorre o efeito aditivo (AD), onde o índice da combinação (IC) é igual a 1 e não potencializam ou anulam o efeito nas células, abaixo da reta, é a área no qual as concentrações de cada um dos fármacos, quando combinadas possuem um efeito sinérgico ( $SG < 1$ ), onde concentrações menores que as concentrações utilizadas para obter o  $IC_{50}$ , potencializam ou diminui o tempo para obter o mesmo efeito.

E por fim, a área acima da reta, é onde ocorre o efeito antagônico (AG), onde o IC é  $> 1$ . Nesse caso, as concentrações presentes nessa área se anulam, não tem nenhum efeito ativo ou podem causar efeitos adversos não desejáveis nas células e /ou no organismo.

Por meio do software Synergy Finder, foi possível carregar as informações relativa à viabilidade celular para as diferentes concentrações de fármacos testado isoladamente. O software por meio dos  $IC_{50}$  de cada fármaco, calcula uma

concentração mais provável de cada um dos fármacos para obter o efeito sinérgico. Para esse caso, o software apontou um IC de 0,95, utilizando uma combinação de 0,004 de PXT e 0,010 de DOX.

Com base nesses dados, foram testadas a condição predita e mais duas condições, variando as concentrações de entrada dos fármacos. No primeiro ensaio, foi testada uma concentração menor de PXT que a predita pelo programa ( $0,002 \text{ mg.mL}^{-1}$ ), e mantida a concentração de DOX ( $0,010 \text{ mg.mL}^{-1}$ ), sendo para essa combinação de  $\text{IC} = 0,73$ . Os resultados ao longo de 180 min, podem ser observados na Figura 49.

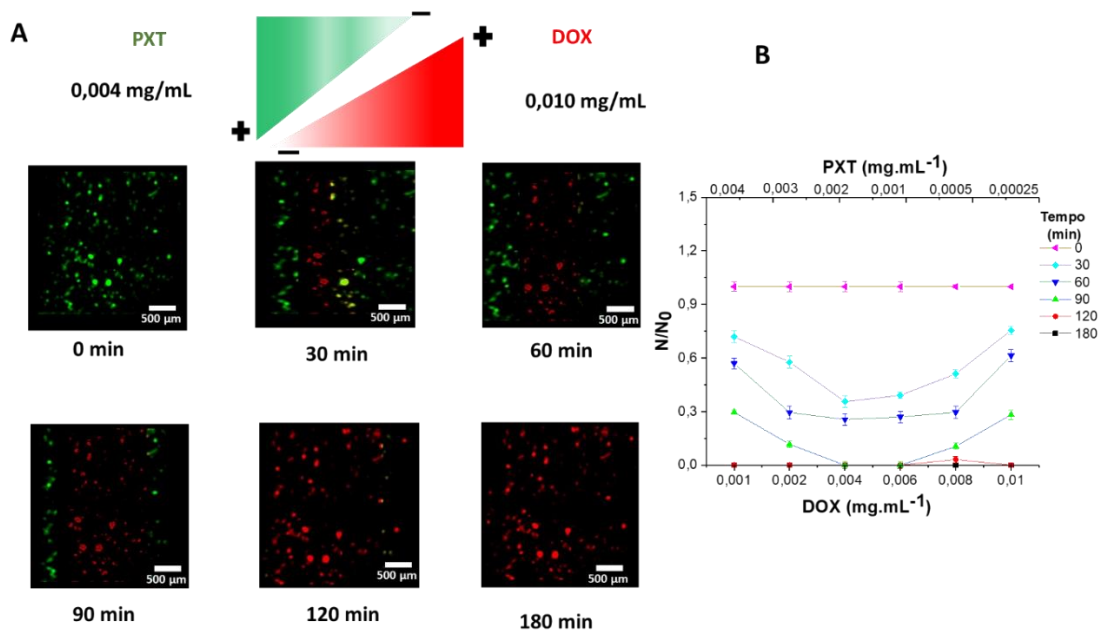


**Figura 49:** Viabilidade celular utilizando gradiente de concentração duplo (DOX e PXT). O ensaio foi realizado por 180 min, com vazão constante de  $7 \mu\text{L.min}^{-1}$ . (A) As células com fluorescência em vermelho, representam as células não viáveis e em verde as células viáveis. (B) Perfil da distribuição da viabilidade das células para cada uma das concentrações geradas nos diferentes tempos.

Na Figura 49A é possível verificar que a viabilidade decresce ao longo do tempo nas concentrações intermediárias geradas pelos compostos.

Na Figura 49B, observa-se que as concentrações de  $0,001$ - $0,0006 \text{ mg.mL}^{-1}$  de PXT e  $0,002$ - $0,008 \text{ mg.mL}^{-1}$  de DOX foram mais eficazes para a morte celular, que as concentrações de entrada de cada fármacos.

Mesmo tendo um efeito de inibição mais eficaz utilizando os dois fármacos, as concentrações testadas não foram capazes de inibir 100 % das células em 180 min, porém é possível verificar o efeito sinérgico, quando comparado com os ensaios de cada fármaco isolado. Assim, foi realizado outro ensaio, desta vez utilizando a combinação predita pelo software, PXT a  $0,004 \text{ mg.mL}^{-1}$  e DOX a  $0,010 \text{ mg.mL}^{-1}$ . Os resultados podem ser observados na Figura 50.

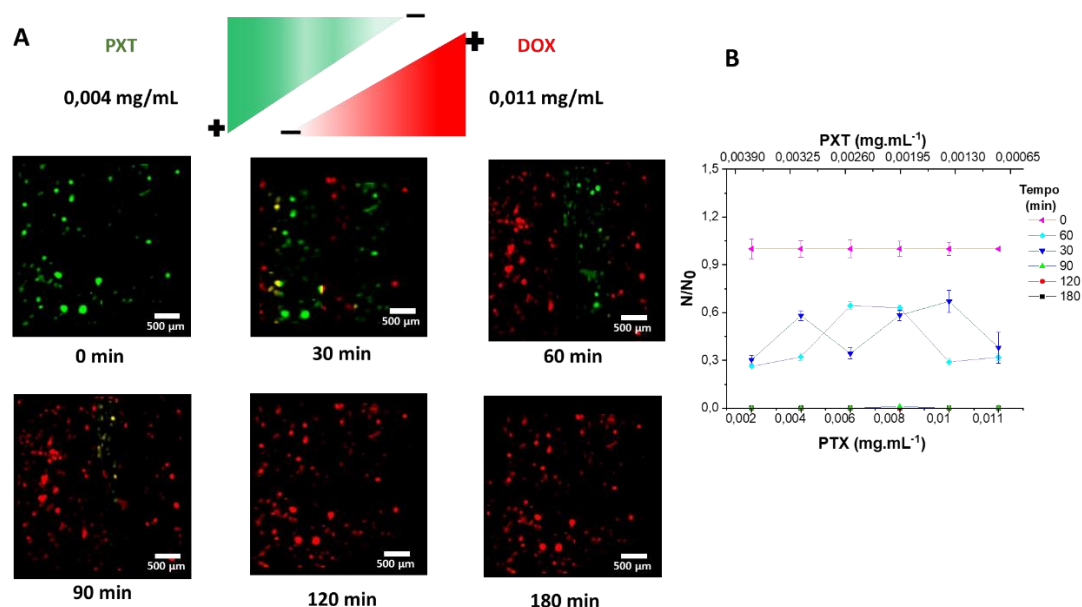


**Figura 50:** Viabilidade celular utilizando o gradiente de concentração duplo (DOX e PXT). O ensaio foi realizado por 180 min, com vazão constante de  $7 \mu\text{L.min}^{-1}$ . (A) As células com fluorescência em vermelho, representam as células não viáveis e em verde as células viáveis. (B) Perfil da distribuição da viabilidade das células para cada uma das concentrações geradas nos diferentes tempos.

Com as novas concentrações de entrada ( $0,004 \text{ mg.mL}^{-1}$  de PXT e  $0,010 \text{ mg.mL}^{-1}$  de DOX), além de verificar a queda da viabilidade nas concentrações geradas pelos dois fármacos (Figura 50A e B), foi possível observar que após o tempo de 90 min, praticamente não há células viáveis. Nesse caso, além de não ter células viáveis o tempo para ocorrer isso foi menor que 180 min. O IC, foi de 0,90, mostrando que quanto mais próximo o valor do IC for de 1, o efeito da queda da viabilidade em um tempo menor.

Com o intuito de diminuir o tempo para obter o efeito sinérgico, foi realizado um terceiro ensaio, variando dessa vez a concentração de entrada da DOX de  $0,010 \text{ mg.mL}^{-1}$

para  $0,011 \text{ mg.mL}^{-1}$  ( $\text{IC}=0,94$ ). A concentração de PXT foi mantida a  $0,004 \text{ mg.mL}^{-1}$ . Os resultados podem ser observados na Figura 51.

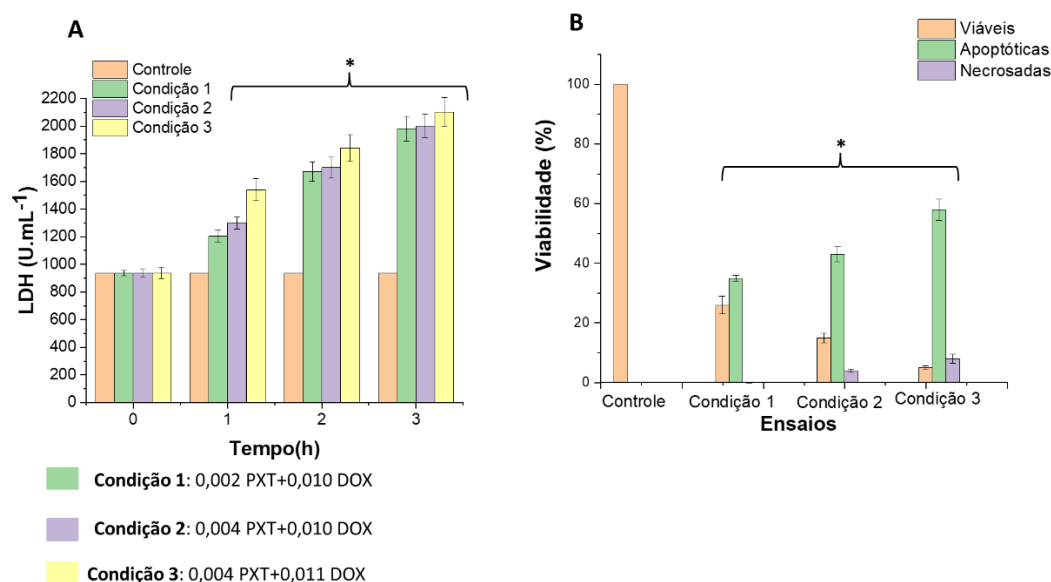


**Figura 51:** Viabilidade celular utilizando o gradiente de concentração duplo (DOX e PXT). O ensaio foi realizado por 180 min, com vazão constante de  $7 \mu\text{L.min}^{-1}$ . (A) As células com fluorescência em vermelho, representam as células não viáveis e em verde as células viáveis. (B) Perfil da distribuição da viabilidade das células para cada uma das concentrações geradas nos diferentes tempos.

Na Figura 51A é possível verificar que após 60 minutos não há células viáveis nessa condição testada. Nesse caso, ainda é possível afirmar que há o efeito sinérgico, no entanto, nessas concentrações de entrada de cada um dos fármacos, o efeito individual de cada fármaco é predominante, isso pode ser verificado pois as células nas extremidades da microcâmara de cultivo entram em senescência antes das células localizadas no meio da câmara de cultivo (Figura 51B). Embora, até 60 min seja ainda possível notar áreas com células viáveis (em verde), devido ao comportamento aleatório de morte celular que ocorre dentro das microcâmaras de cultivo, fica difícil mensurar quais concentrações intermediárias geradas pelos dois fármacos são necessárias para obter o efeito de morte celular.

Vale ressaltar que, com as concentrações de entrada testadas nesse ensaio, comparando com o segundo ensaio, proporcionou uma diminuição de 60 minutos para obter a morte celular de todas as células presente.

Além disso, foi realizada a análise enzimática de *lactato desidrogenase* (LDH) e Anexina V/PI para cada um dos ensaios (Figura 52).



**Figura 52:** Análise da eficácia das combinações de fármacos ao longo do tempo (A) Análise indireta utilizando o método de quantificação da enzima lactato desidrogenase (LDH) ao longo de 180 min para cada ensaio realizado (B) Análise do mecanismo de morte celular, dividindo as células em: viáveis, apoptóticas e necrosadas. Foi utilizado o marcador Anexina V/PI ao final dos ensaios (180 min). (\*) significam diferenças estatísticas entre as amostras (ANOVA  $p < 0,05$ ).

A análise de LDH (Figura 52 A), mostrou liberação maior de lactato à medida que aumentavam as concentrações de fármacos. A análise estatística (ANOVA), apresentou diferenças estatísticas entre as amostras em um intervalo de confiança  $p < 0,05$ , comprovando que a ação de cada fármaco tem um efeito diferente nas células. Além disso, na análise do mecanismo de morte celular, utilizando os marcadores Anexina V/PI, foi possível verificar que houve um aumento significativo de células apoptóticas na condição 3, assim como o aumento de células necrosadas. Mostrando que o mecanismo de cada um dos fármacos é potencializado quando combinados (Figura 52B).

As concentrações preditas de DOX e PXT pelo software Synergy, em comparação com o experimental foram eficientes. Sendo as combinações mais eficiente, as combinações utilizadas nas condições 1 e 2. Em termos de comparação, não foi possível comparar os resultados aqui obtidos, com resultados em placas (métodos tradicionais),

uma vez que não foi possível obter o IC<sub>50</sub> nas concentrações testadas e no tempo de 180 para a DOX.

Diferentes estudos de entrega simultâneas de dois ou mais fármacos, mostram um grande potencial para diminuir o efeito de MDR, utilizando concentrações menores de cada fármaco combinado que cada fármaco na forma individual (CARVALHO et al., 2020; FENG et al., 2020; YAN et al., 2020). Além disso, deve ser considerados os efeitos citotóxico ao longo do tempo em tecidos íntegros; concentrações altas do fármaco, apesar de ocasionar um efeito tóxico nas células, podem gerar um efeito citotóxico uma vez que pode ocasionar acúmulo de fármacos nos tecidos, principalmente nas células hepáticas e cardíacas (POLJAKOVÁ et al., 2008; GRIGORIAN; O'BRIEN, 2014).

Li et al., (2016) desenvolveram um microdispositivo em 2 andares. O primeiro andar é composto por uma rede com múltiplos canais, conectados de forma circular. Em cada uma das extremidades tinha uma entrada e uma única saída no meio do dispositivo. No andar inferior, estão presentes as câmaras de cultivos para cada um dos canais. Os autores utilizaram células de câncer de fígado humano (HepG2), para verificar o mecanismo de efluxo de fármaco, principal causa da resistência ao medicamento (MDR). Para os ensaios foram utilizados o fármaco ciclosporina A, um imunossupressor e PBS para gerar diferentes concentrações do fármaco (0-20mM). Como resultado, os pesquisadores observaram que concentrações intermediárias (6-12mM) eram mais eficazes, e não ocasionavam o MDR.

Nesses casos, é necessário avaliar o tempo de resposta com a concentrações iniciais utilizadas de cada fármaco a ser testado, havendo um balanço para evitar efeitos citotóxicos. Nos ensaios apresentados, apesar da condição 3 obter uma melhor resposta em termo de viabilidade ao longo do tempo, as concentrações de entrada de cada um dos fármacos são mais elevadas, e avaliando isso ao longo de um tratamento, pode ocasionar efeitos citotóxicos em diferentes tecidos. O uso de concentrações menores, por sua vez, como nas condições 1 e 2, que apresentaram também boas respostas de viabilidade, quando comparado aos ensaios dos fármacos de forma isolada, podendo ser uma boa opção para iniciar o tratamento personalizado e rápido de alguns tipos de tumores e evitar o MDR.

E além disso, ensaios utilizando duas concentrações de fármacos de forma simultâneas e em tempo real em microdispositivos, até o momento não foram reportados na literatura. A estratégia apontada nesse trabalho é um método eficiente para observar ação de dois fármacos simultaneamente, de uma forma simplificada.

### 5.3 Conclusão

O microdispositivo permitiu verificar as concentrações isoladas e combinadas dos medicamentos e seus efeitos nas células do câncer de mama, observando os efeitos dos medicamentos nas células de forma rápida e em tempo real. Além disso, foi possível observar a comunicação celular durante o teste (180min). Essas análises, que pelo método tradicional (placas), são difíceis e exaustivas de realizar. O microdispositivo serve como uma tecnologia que pode ser utilizada para tratamento individualizado, pois não requer muitas amostras e os custos de fabricação e operação são relativamente baratos.

A concentração dos fármacos utilizados sem gradiente de concentração para inibir 50% das células ( $IC_{50}$ ) foi a mesma verificada utilizando o gradiente de concentração, demonstrando que o gradiente de concentração é confiável para ensaios de 180 min. No entanto, nesse tempo de análise não foi possível calcular o  $IC_{50}$  para a DOX em testes em placas convencionais. Uma alternativa seria aumentar as concentrações testadas ou o tempo de exposição das células ao fármaco.

O gradiente de concentração, nas condições experimentais utilizadas, mostra-se confiável, uma vez que o efeito da senescência celular no período de tempo (180 min) é ocasionado predominantemente, pela concentração e a ação do fármaco.

Além disso, microdispositivo possibilita observar o gradiente duplo de fármacos, permitindo estimar as concentrações ideais para obter o efeito sinérgico local. Vale ressaltar que em organismo *in vivo*, o gradiente de concentração é muito diferente e deve ser levado em consideração a meia vida do fármaco no organismo. Os ensaios aqui realizados, apenas leva em consideração a eficácia dos fármacos local e no tempo de infusão dos fármacos.

Testes futuros seria interessante acompanhar as células após a infusão por pelo menos 24h, para obter respostas mais precisas quanto a viabilidade e mecanismo de morte

celular, uma vez que o microdispositivo é uma excelente ferramenta para esse tipo de observação.

Este estudo apresenta dados importantes que podem ajudar a prevenir efeitos citotóxicos e cumulativos em tecidos não tumorais e efeitos MDR. O dispositivo microfluídico também permite observar concomitantemente a sinalização célula-célula e os efeitos sinérgicos. Essa descoberta pode ajudar a entender o comportamento celular em diferentes concentrações de drogas, aumentar o sucesso do tratamento para cada paciente. Como o microdispositivo é reversível e simples de usar, as células podem ser facilmente recuperadas para análises complexas.

A microfluídica pode ser uma ferramenta poderosa para entender os fenômenos bioquímicos que ocorrem em sistemas fisiológicos em tempo real, de menor custo e mais próximos aos ensaios *in vivo*.

---

## Capítulo 6- Avaliação *On a chip* do efeito combinado e individual de fármacos em esferoides de câncer de mama<sup>2</sup>

---

### Resumo

Técnicas que possam prever de forma confiável a eficácia do medicamento para os mais diversos tipos de tumores sólidos são necessárias, visto que os tratamentos utilizados muitas vezes não conseguem acessar o tumor por inteiro. Neste contexto, esse trabalho avaliou os efeitos isolados e combinado de fármacos, em microfluídica. Para tentar simular um tumor sólido, foram utilizados esferoides de câncer de mama como modelo. Para esse ensaio foram utilizados novamente os fármacos doxorrubicina (DOX) e paclitaxel (PXT), e a linhagem MCF-7 (Michigan Cancer Foundation) para a formação dos esferoides. O microdispositivo utilizado foi o relatado previamente por Vit et al. (2021), com uma alteração de projeto, para coletar e a enzima lactato desidrogenase (LDH) e fazer a reação da enzima com o reagente enzimático no próprio dispositivo. Os esferoides apresentaram tamanhos médios de 145µm, com índice de esfericidade de 0,89. Para avaliar a viabilidade, foi utilizado o marcador *Live and Dead*, onde as células viáveis apresentam fluorescência verde. Os esferoides foram normalizados pela área inicial dos esferoides (A/A0) e a viabilidade dos agregados foi calculada por meio da diminuição das áreas em verde. A análise da viabilidade após os ensaios com os fármacos (de forma isolada e combinada), apontaram que a queda da viabilidade dos esferoides ocorreu apenas nos ensaios onde foram administrando os fármacos (DOX e PXT) de forma combinada, cerca de 80-85% das áreas dos esferoides não estavam viáveis no tempo de 180. Além disso, a utilização dos poços para a coleta de LDH foi eficaz, diminuindo perdas de amostras em até 24% e aumentando a confiabilidade dos dados obtidos. Dessa forma, o microdispositivo se apresenta como uma plataforma viável e versátil, uma vez que permite o estudo de sistemas complexos.

**Palavras-chaves:** Microdispositivo, análise in situ, esferoides, cultivo 3D, câncer, *drug screening*.

---

<sup>2</sup> Patente depositada (setembro 2021) INPI-BR 10 2021 015397-0

## 6.1 Introdução

Muito da queda da mortalidade do câncer deve-se ao avanço constante na área médica e farmacêutica, que atuam intensamente para erradicar essa doença por isso sistemas que proporcionem melhor compreensão da progressão do tumor são necessários. Parte importante no processo de descoberta de novos medicamentos, são os ensaios utilizando células 2D (células bidimensionais), pois são métodos simples, rápidos e econômicos, em comparação com testes em modelos *in vivo* (animais) em grande escala (KAEMMERER et al., 2016).

Embora seja um método bem consolidado, a técnica de cultivo 2D apresenta limitações, uma vez que, quase todas as células no ambiente *in vivo* estão rodeadas por outras células e por matrizes extracelulares (ECM) em uma conformação tridimensional (3D). A cultura de células 2D não leva em consideração o ambiente 3D natural das células. E como resultado, os testes de cultura de células 2D podem fornecer dados discrepantes e não preditivos quando comparados com os testes *in vivo* (ZHENG et al., 2012; WANG; TONG; YANG, 2014; HAN; KWON; KIM, 2021).

Dentre os modelos 3D, destacam-se os esferoides, que são agregados celulares. Estes sistemas são mais sofisticados, robustos e complexos, além de ser um sistema mais próximo ao encontrado em diversos tecidos animais. A criação de um ambiente 3D adequado, pode prover resultados de ensaios de fármacos mais acurados quando comparados com os resultados obtidos em testes *in vivo* (KELM et al., 2003; BRESCIANI et al., 2019; RYU; LEE; PARK, 2019).

De forma complementar, a microfluídica é uma plataforma interessante, uma vez que atua de forma dinâmica, possibilita a criação de microambientes muito próximo a sistema fisiológico, proporcionando interações celulares que melhoram a resposta celular. Os microdispositivos ainda possibilitam obter uma gama de dados, uma vez que possibilita a análise em tempo real. Além de proporcionar respostas similares aos ambientes *ex vivos* (RISMANIAN; SAIDI; KASHANINEJAD, 2020; FANG et al., 2021; LI et al., 2021).

Neste contexto, esse capítulo avaliou os resultados dos efeitos dos fármacos (DOX e PXT) nas formas isoladas e combinadas em microfluídica. Para isso, foram utilizados esferoides de câncer de mama (MCF-7), como modelos de tumores sólidos. O

microdispositivo utilizado foi o mesmo relatado previamente por Vit et al. (2021), com uma pequena alteração de projeto, sendo a criação de poços de coleta no próprio microdispositivo para a coleta e a reação da enzima lactato desidrogenase (LDH), liberada pelas células. Os esferoides foram avaliados: morfológicamente, em termo de metabolismo celular, quanto a viabilidade dos agregados e mecanismo de morte celular. Para analisar os tamanhos dos esferoides foi utilizando o software ImageJ e a viabilidade foi mensurada por meio de uma rotina de MATLAB. O microdispositivo proporcionou a criação de um ambiente 3D adequado, obtendo respostas mais próximas a sistemas *in vivo* e em tempo real

## 6.2 Resultados e Discussão

Nos capítulos anteriores, o microdispositivo foi avaliado operacionalmente, biologicamente em cultura com células imobilizadas em Matrigel® e agarose, onde foi verificado a eficiência do gradiente de concentração e a formação do gradiente duplo, utilizando dois fármacos simultaneamente. Nesse capítulo, foi verificado os parâmetros do ensaio de *drug screening* utilizando as células no formato de esferoides (agregado celular), que é uma conformação mais robusta e comparação as células testadas previamente. As células no formato de esferoides, são mais próximas ao encontrado em sistema *in vivo*, tornando os resultados obtidos neste sistema mais confiáveis.

Os esferoides foram formados em placas não aderentes com matriz extracelular e após a formação, eles foram retirados das placas e adicionados no microdispositivo, submersos novamente por uma mistura contendo Matrigel® e agarose. Os agregados celulares foram caracterizados quanto a tamanho, morfologia e viabilidade.

Após obter os parâmetros dos esferoides, os mesmos foram submetidos a diferentes concentrações de DOX e PXT; com o resultado obtido nos ensaios dos fármacos na forma isolada, foram escolhidas as concentrações mais promissoras para o ensaio dos fármacos combinados. Durante todos os ensaios foram obtidas imagens, utilizando microscopia de fluorescência e analisadas a viabilidade utilizando uma rotina de MATLAB. Além disso, foi realizada uma pequena modificação no microdispositivo, que permite também coletar o sobrenadante sem perdas e proporcionar a reação do lactato desidrogenase com o reagente enzimático em tempo real. Os resultados obtidos, serão discutidos nos itens a seguir.

### 6.2.1 Avaliação operacional dos poços de coleta

Após a fabricação dos poços de coleta, foi verificado se os poços permitem que ocorra reações e assim, possibilite no futuro o emprego de sensores para realizar análises dos metabolitos excretados pelas células, no próprio microdispositivo e em tempo real. Os poços além de permitirem adicionar sensores também diminuem a perda ocasionada pela coleta realizada por meio de mangueiras e *ependorf*. As perdas se tornam bastantes significativas, se levar em consideração o fato que pouca quantidade de meio liberada durante o processo, e muito dos metabólitos excretados ficam aderidos nas mangueiras ou no fundo dos tubos, impossibilitando a retirada.

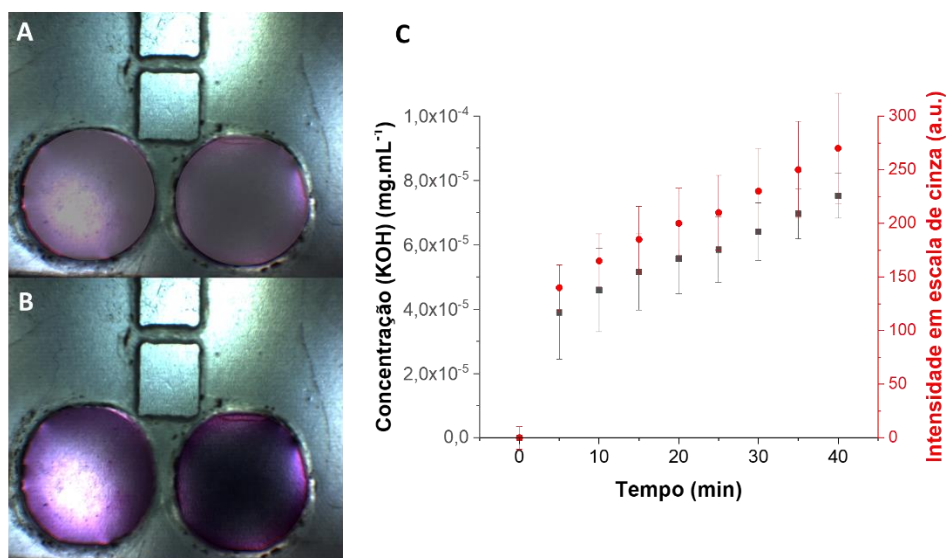
Assim, foram criado um sistema de poços (Figura 24), que ficam situados no andar inferior do microdispositivo, na saída de cada um de cada um dos canais de alimentação. Esses poços possibilitam que seja adicionado um reagente/ marcador específico que irá reagir em tempo real com o metabólito de interesse, e o mais interessante: sem que ocorra perdas durante o processo.

Os poços possuem um tamanho que possibilita a coleta desses metabolitos de forma simples (com auxílio de micropipetas), para posteriormente a reação seja analisada em espectrometria e/ou leitor de placas diretamente. Em caso de metabólitos, que ao serem liberados sofrem mudanças de tonalidade expressivas, é possível obter imagens e analisar a concentração liberada por meio do aumento da intensidade ao longo do tempo diretamente no microdispositivo, uma vez que haja uma curva analítica pré-definida.

Antes de realizar a análise de *lactato desidrogenase* direto nos poços, foi avaliada a capacidade dos poços em funcionar como microrreatores de perfusão.

Nesse caso, para observar e validar a reação que ocorre nos poços de forma clara e precisa foi utilizada fenoltaleína (1% m/v) como o reagente colorimétrico e escoado nas duas entradas ( $7 \mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) hidróxido de potássio (KOH-0,01 mM).

Desta forma, foi possível por meio de microscopia óptica com câmera acoplada, observar a mudança de tonalidade ao longo do tempo, como pode ser observada na Figura 53.



**Figura 53:** Imagem dos poços após a reação da fenolftaleína com hidróxido de potássio (0,01M). (A) tempo 10 min, (B) tempo 40 min. Durante todo o ensaio (40 min) a vazão foi mantida constante de 7  $\mu\text{L}.\text{min}^{-1}$ . Foi observado a mudança da tonalidade com o aumento da concentração de hidróxido de potássio. Por meio do software ImageJ, foi possível correlacionar o aumento da concentração com a mudança de tonalidade. Nota-se pelo perfil presente (C), que o aumento da intensidade em escala de cinza é diretamente proporcional ao aumento da concentração de hidróxido de potássio ao longo do tempo, sendo possível avaliar essas mudanças em tempo real.

A Figura 53 A apresenta a mudança de tonalidade após 10 min e 40 min (a tonalidade rosácea torna-se mais intensa à medida que reage com o KOH).

O perfil de intensidade permite relacionar as diferentes concentrações de KOH que reagiu com a fenolftaleína com a intensidade em escala de cinza (pixel) ao longo do tempo (Figura 53B). No tempo de 10 minutos o regime é transiente, ou seja, ainda há o excesso de fenolftaleína para a quantidade de KOH. Assim, à medida que o KOH é acumulado no poço coletor da saída do microdispositivo, ocorre a reação com a fenolftaleína em excesso, e consequentemente a alteração tonalidade. Após o escoamento do KOH, é possível verificar um perfil linear da intensidade da fenolftaleína +KOH nos poços coletores.

Um estudo similar foi realizado anteriormente com glicose, para verificar, nesse caso, a difusão da glicose através de uma membrana porosa. O intuito desse ensaio foi verificar se a membrana utilizada para limitar a movimentação da bactéria *E.coli*, permitia a passagem de nutrientes (glicose), essenciais para o crescimento microbiano. Nesse caso

os autores utilizaram um reagente enzimático colorimétrico que quantifica a concentração de glicose presente em uma amostra. A presença de glicose na amostra, reage com a enzima, dando uma tonalidade rosácea, à medida que aumenta a tonalidade de glicose, há também um aumento da intensidade da tonalidade. Os autores utilizaram a técnica de correlacionar a concentração de glicose com a intensidade emitida com para determinar a concentração de glicose para cada tempo (t). Dessa forma, foi observado o aumento linear da glicose ao longo de 60 min, provando que não havia limitação de nutrientes pela membrana (VIT et al., 2018).

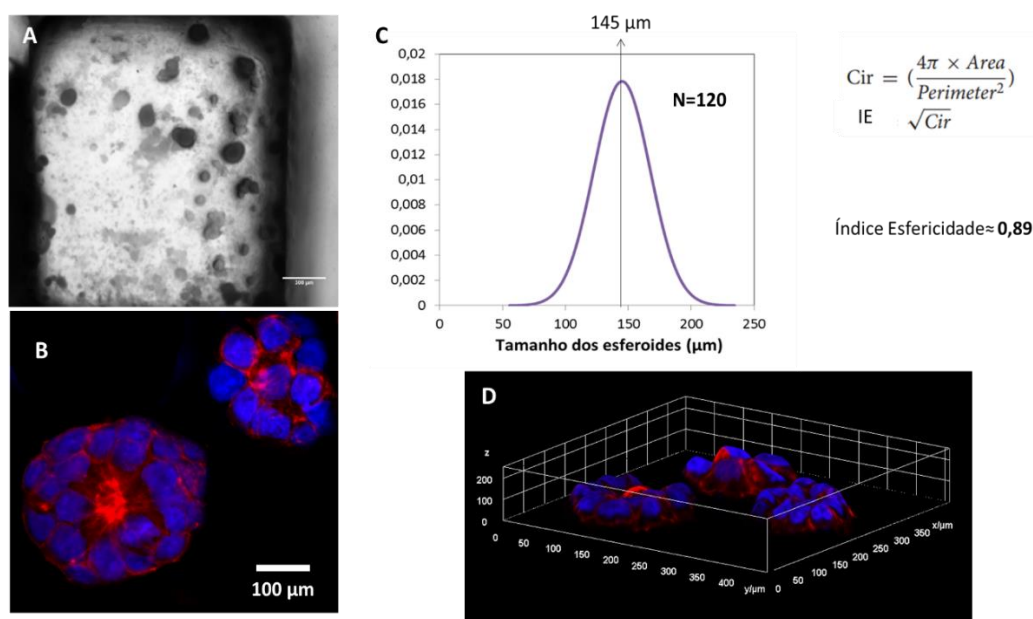
O mesmo experimento relatado acima, foi realizado novamente neste Capítulo, para comprovar que os poços permitem que ocorra reações ao longo do tempo. Após de validar essa parte do microdispositivo, foram realizados os testes biológicos, utilizando as células em formato de esferoides.

### **6.2.2 Formação e caracterização dos esferoides**

Para formar os esferoides de MCF-7, as células foram colocadas em uma placa de superfície não aderente e submersas em uma matriz extracelular (Matrigel<sup>®</sup>), de forma a proporcionar o agrupamento dessas células em estruturas esféricas.

A técnica para formar esferoides utilizando matriz extracelular e superfície não-aderente, permite produzir um grande número de esferoides de forma simples e rápida. O tempo para o crescimento dos esferoides de MCF-7 foi de 5 dias. Alguns trabalhos relatam o uso de hormônios como insulina para a formação de esferoides de MCF-7 (MAURO et al., 2007; FANG et al., 2019), no entanto, a suplementação com insulina não modificou o tempo e nem o tamanho dos esferoides quando comparado com esferoides que não foram suplementados com insulina.

Após a formação dos esferoides, eles foram retirados das placas e adicionado em microdispositivo. Os esferoides foram caracterizados morfolologicamente (tamanho e a esfericidade) antes e após da inoculação no microdispositivo, os dados relativos as caracterizações realizadas em esferoides cultivados em microdispositivo, estão agrupados e podem ser observados na Figura 54.

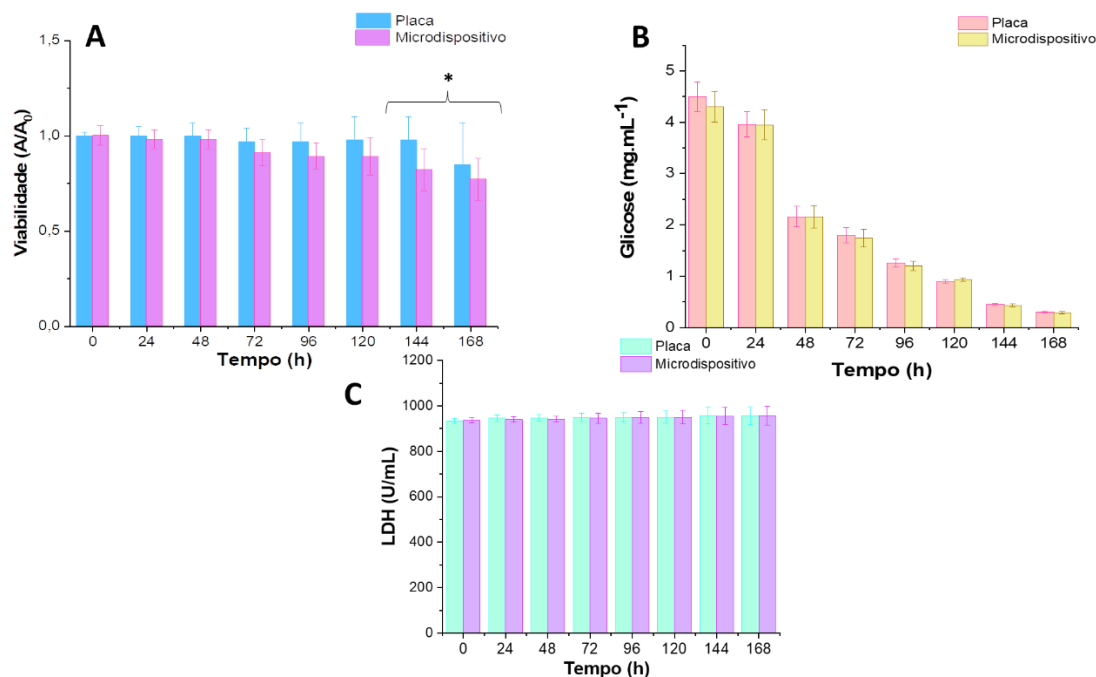


**Figura 54:** Esferoides após 5 dias mantidos nas microcâmaras. (A) Distribuição de tamanhos dos esferoides na câmara de cultivo presentes na estrutura 3D (Matrigel® + agarose). Barra de escala de 500 μm; (B) Imunocitoquímica dos esferoides, utilizando os marcadores DAPI (azul) para núcleo e faloídina (vermelho) para citoesqueleto. Imagem obtida em e microscopia confocal de fluorescência; (C) Perfil da distribuição do diâmetro médio dos esferoides, utilizando um N=120 esferoides. A partir do diâmetro médio, foi possível calcular índice de esfericidade dos esferoides (0,89) (D) Tamanho médio dos esferoides após 5 dias. Análise realizada a partir das imagens obtidas em confocal.

Na Figura 54A, é possível ver os esferoides distribuídos ao longo das microcâmaras, apesar dos tamanhos não serem uniformes, é possível verificar que, mesmo dentro das câmaras, os esferoides apresentaram núcleo (azul) e citoesqueleto (vermelho) íntegros após 5 dias (Figura 54B). Em termos de tamanho (Figura 54C), o perfil de distribuição de diâmetro (N=120) para um, variou entre 50 a 230 μm, sendo o diâmetro médio de 145μm e altura de média de 100μm (Figura 54D). Os esferoides em placas, apresentaram diâmetro médio, índice de esfericidade e estrutura similares que os esferoides em microdispositivos (ver imagens ANEXO IV).

Os esferoides em microdispositivo e em placas também foram avaliados quanto a viabilidade e metabolismo de glicose. A viabilidade celular foi mensurada correlacionado as áreas dos esferoides, uma vez que não é possível analisar as células isoladamente. Assim, os esferoides foram marcados, e por meio da diminuição as áreas com fluorescência em verde e aumento das áreas de fluorescência vermelha/alaranjada nos

esferoides, foi possível calcular a viabilidade. Os esferoides foram normalizados dividindo apenas as áreas em verde para cada tempo(t) pela área inicial ( $A_0$ ). Os resultados obtidos podem ser verificados na Figura 55.



**Figura 55:** Análise do metabolismo celular em placas e em microdispositivo. (A) viabilidade dos esferoides ao longo de 186 h (7 dias), (B) Análise do consumo da glicose ao longo do tempo; (C) análise da liberação do lactato desidrogenase (LDH). Para todos os ensaios, foram utilizados um  $N=120$  esferoides. ANOVA  $p<0,05$ , (\*) representa diferenças significativas estatisticamente.

A viabilidade dos esferoides para os tempos de 0-120h (Figura 55A), não houve diferenças significativas em termos estatísticos (ANOVA  $p<0,05$  e teste de Tukey) dos esferoides cultivado em placas e em microdispositivo. Porém, após 120 h, há diferenças estatísticas na viabilidade dos esferoides (144-166 h). Dessa forma, para obter uma confiabilidade maior, os ensaios foram realizados dentro da janela de 120h.

Foi observado que, mesmo com a adição de meio de cultivo fresco a cada 24 h, concentração de glicose, decai ao longo do tempo (Figura 55B), tanto para o cultivo em placa, quanto para o cultivo em microdispositivo.

A queda da concentração de glicose corresponde ao consumo do nutriente pelas células. As células utilizam a glicose em seu ciclo para energia e assim, se manterem

viáveis e se multiplicarem. No caso das células tumorais, o consumo de glicose ainda é mais elevado, pois as células utilizam a glicose para produção de ácido láctico, acidificando o meio intracelular e assim, propícia a multiplicação celular (ZHENG et al., 2012; MAZZIO et al., 2020).

A concentração de lactato desidrogenase liberada (LDH) e o consumo glicose não tiveram mudanças estatisticamente significativas (ANOVA  $p < 0,05$  e teste de Tukey). No entanto, observando o consumo de glicose presente no meio, e correlacionado o consumo de glicose com a produção de lactato (Figura 55C), pode-se inferir que as células estavam viáveis tanto nas placas como no microdispositivo, A concentração de lactato e o consumo de glicose são parâmetros que podem servir para estimar, indiretamente, a viabilidade celular ao longo do tempo.

No caso da perda da viabilidade, ou mesmo, a morte celular as concentrações de lactato irão aumentar, pois a enzima lactato desidrogenase (enzima responsável pela produção de lactato), migra do meio intracelular para o meio de cultivo (extracelular). Em contrapartida, o consumo de glicose presente no meio não irá sofrer alterações, uma vez que as células não estão consumindo a glicose.

Além disso, após 120h (5 dias), as células não apresentaram mudanças em sua morfologia. Os esferoides de MCF-7, apresentaram núcleo e citoesqueleto íntegros. É possível notar na Figura 52B que a conformação das células proporciona o início da formação do lúmen. O lúmen são regiões apicais se voltavam para um direcionamento comum, muito semelhante a uma glândula mamária (BUSSADOR DO AMARAL; SHINITI URABAYASHI; MARIA MACHADO-SANTELLI, 2010). Dessa forma, as células se organizam como tecido mamário presente *in vivo*, sendo um modelo mais verossímil para estudo *in vitro* (KELM et al., 2003).

Apesar das técnicas não serem comparáveis em termo de volume de meio e disponibilidade de nutrientes, podemos comparar em termos de morfologia (ambos os cultivos (imagens de cultivo em placas -ANEXO IV), uma vez que apresentam conformações idênticas. Nesse caso específico, no período de incubação, as microcâmaras presentes no microdispositivo funcionam como micropoços, pois não há escoamento constante de fluídos. O meio nesse caso, foi repostado a cada 24h para ambos

os cultivos, e mesmo o volume das microcâmaras sendo menor que os poços, a quantidade de esferoides presente no microdispositivo (em proporção) é menor.

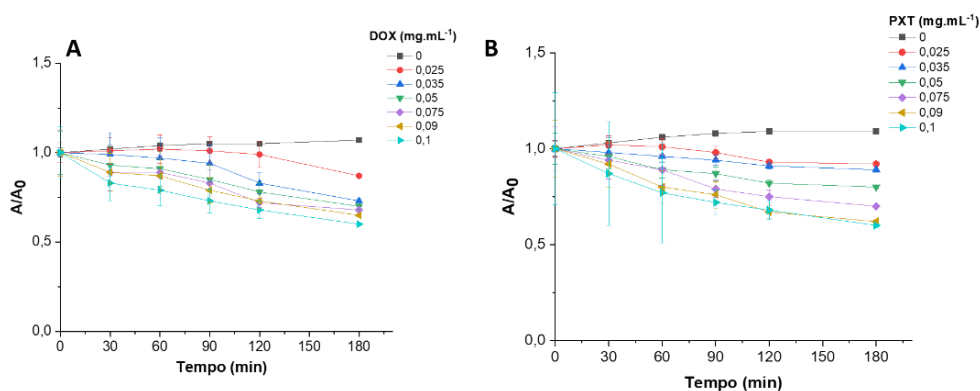
Em termos metabólicos, até o tempo de 120h não houve mudanças significativas no ciclo das células presentes no microdispositivo, que possam influenciar nos resultados obtidos. Dessa forma, optou-se em fazer os ensaios com os fármacos apenas com os esferoides em microdispositivo, visto que os resultados em placas e em microdispositivo não são comparáveis, por diversos motivos já apresentados e discutidos nos capítulos anteriores.

### 6.2.3 Avaliação da viabilidade dos esferoides na presença de DOX e PXT

Os esferoides são sistemas complexos, que devido a sua conformação (células altamente agregadas e alto empacotamento do sistema), a difusão dos fármacos é dificultada quando comparado com as células na conformação 2D ou não agregadas. Isso afeta diretamente na concentração de fármaco que deve ser administrada para diminuir a viabilidade dos esferoides (EDMONDSON et al., 2014).

Por outro lado, por serem sistemas mais próximo aos sistemas encontrados *in vivo*, auxiliam na escolha de uma concentração adequada de um fármaco, principalmente se tratando de tumores sólidos (KAEMMERER et al., 2016). Nesse caso, a microfluídica pode ser uma ferramenta poderosa para mimetizar esses microambientes.

Dessa forma, primeiramente foram avaliadas diferentes concentrações dos fármacos DOX e PXT, em microdispositivo, sem a geração de gradiente de concentração, para verificar o comportamento celular. O ensaio foi conduzido por 180 min, e os resultados podem ser observados na Figura 56.



**Figura 56:** Perfil cinético da variação da área dos esferoides ( $A/A_0$ ) nas diferentes concentrações de fármaco. (A) DOX e (B) PXT. A corresponde a área dos esferoides no tempo (t) e  $A_0$  corresponde a área inicial ( $t=0$ ) dos esferoides. O ensaio foi realizado durante 180 min, a 37°C, a uma vazão constante de  $7\mu\text{L}.\text{min}^{-1}$ .

Nas Figuras 56A e 56B, é possível observar que o controle (esferoides não tratados) tiveram um leve aumento das suas áreas, isso pode ter ocorrido pelo crescimento celular ao redor dos esferoides. Porém, esse aumento não é estatisticamente significativo (ANOVA  $p>0,05$ ). Na presença de cada um dos fármacos testados, foi observado um comportamento diferente nos esferoides.

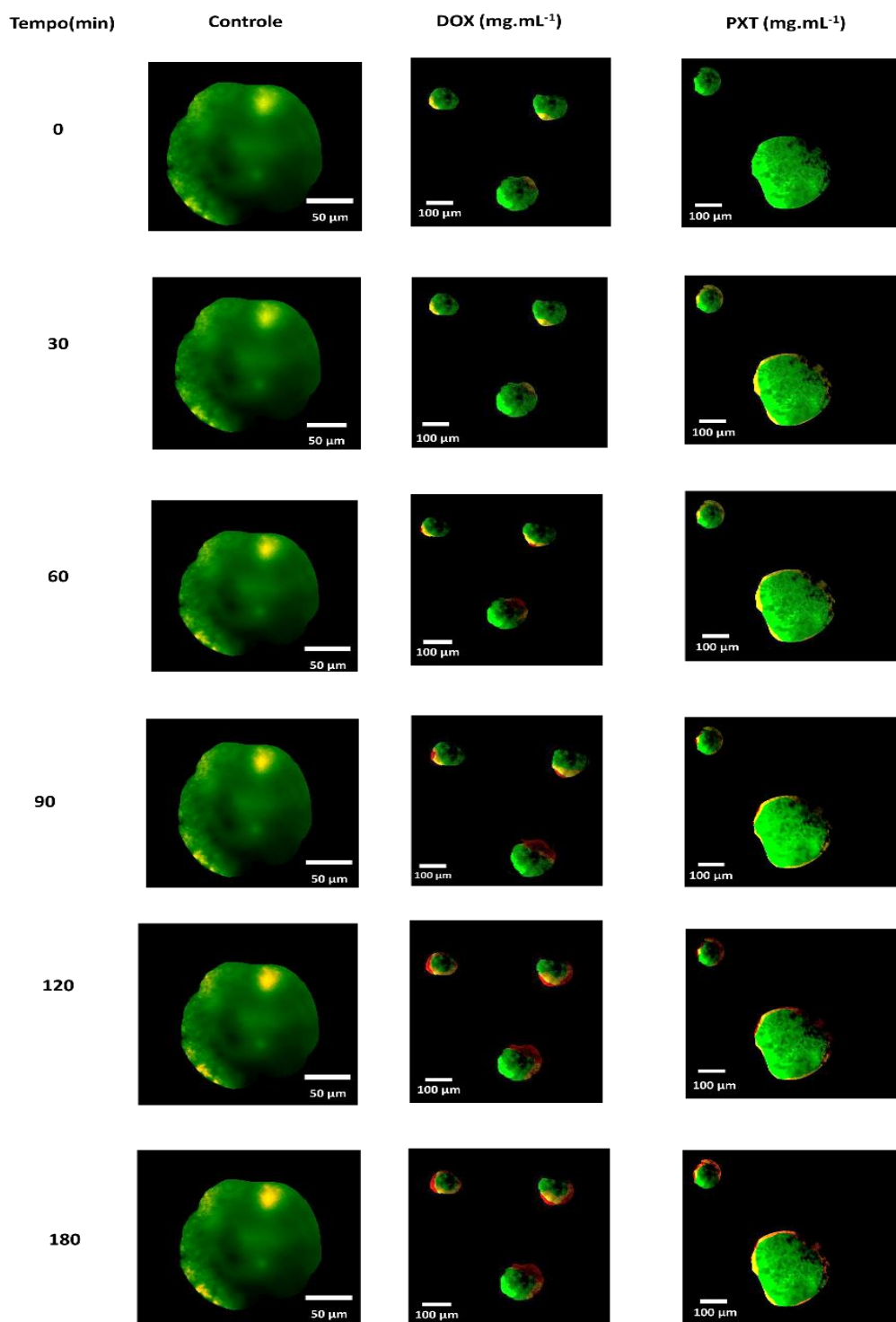
Neste caso, para as concentrações testadas, observa-se queda, mesmo que pequena, da viabilidade celular (áreas em vermelho). No caso do PXT e da DOX, a concentração que proporcionou uma queda da viabilidade dos esferoides no tempo de 180 min, foi a concentração de  $0,1\text{ mg.mL}^{-1}$ . Nota-se, que mesmo utilizando a concentração mais elevada testada, ela não foi suficiente para diminuir a viabilidade dos esferoides em 50% ou menos (Tabela 3).

**Tabela 3:** Viabilidade celular dos esferoides ( $A/A_0$ ) após ao tratamento com DOX E PXT na concentração de  $0,1\text{ mg.mL}^{-1}$ .

| <b>Viabilidade celular (<math>A/A_0</math>)</b> |                 |                                                 |                                                 |
|-------------------------------------------------|-----------------|-------------------------------------------------|-------------------------------------------------|
| <i>Tempo (h)</i>                                | <i>Controle</i> | <i>PXT (<math>0,1\text{ mg.mL}^{-1}</math>)</i> | <i>DOX (<math>0,1\text{ mg.mL}^{-1}</math>)</i> |
| 0                                               | 1±0             | 1±0                                             | 1±0                                             |
| 30                                              | 1±0             | 0,87±0,030                                      | 0,83±0,029                                      |
| 60                                              | 1,01±0,001      | 0,77±0,030                                      | 0,79±0,025                                      |
| 90                                              | 1,01±0,001      | 0,75±0,028                                      | 0,73±0,021                                      |
| 120                                             | 1,03±0,002      | 0,70±0,027                                      | 0,68±0,021                                      |
| 180                                             | 1,04±0,002      | 0,65±0,025                                      | 0,6±0,018                                       |

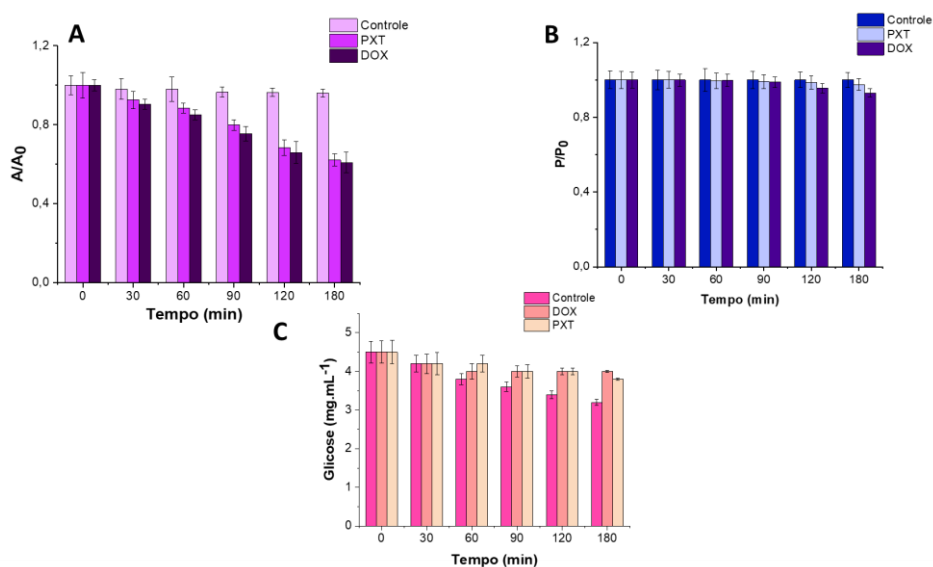
Além disso, vale ressaltar que concentrações elevadas, apesar de diminuir a viabilidade celular, também podem ser citotóxicas, acumulando o fármaco em tecidos saudáveis e causando danos a diferentes órgãos.

Em termos da diminuição das áreas dos esferoides (em todas as concentrações testadas), a DOX foi que apresentou melhor eficiência. Para observar os eventos quantificados na concentração  $0,1 \text{ mg. mL}^{-1}$ , foram obtidas imagens dos esferoides no microdispositivo, para ambos os fármacos (Figura 57) por 180 min.



**Figura 57:** Microscopias de fluorescência dos esferoides de MCF-7 mantidos na presença de DOX ou PXT no microchip. O microchip operou com a infusão de DOX ou PXT na concentração e 0,1 mg.mL<sup>-1</sup>. Para o controle, o microchip teve infusão apenas com meio de cultivo (RPMI). Os ensaios ocorreram por 180min, a 37°C, 5 % de CO<sub>2</sub> e vazão de 7 μL.min<sup>-1</sup>.

Como pode ser observado na Figura 57, foi realizado o rastreamento de alguns esferoides, após obter o valor médio de esferoides (Figura 56A e 56B), para cada fármaco. É possível notar que, os esferoides tratados com a DOX, apresentaram maior área vermelha, comparados com os esferoides os tratados com PXT. Vale ressaltar, que essa análise foi realizada contando todos os esferoides presentes e calculado a área média de cada esferoide ( $A/A_0$ ). Para cada um dos fármacos, também foi realizado o cálculo normalizado do perímetro (P), para cada tempo testado. Na Figura 58, é possível verificar a queda da viabilidade ( $A/A_0$ ), quando observamos a diminuição das áreas em verde, além da diminuição do perímetro ( $P/P_0$ ) e o consumo de glicose presente no meio.



**Figura 58:** Avaliação da viabilidade dos esferoides na presença de PXT ou DOX ( $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$  para cada fármaco) na prese. (A) Perfil das áreas em verde (viáveis) dos esferoides ao longo do tempo. Para quantificar, foi utilizado o marcador *Live and Dead*, avaliando apenas as áreas em verde ao longo do tempo. Os resultados obtidos em cada tempo (t), foi normalizado pela área inicial ( $A_0$ ). (B) Perímetro médio dos esferoides para cada fármaco testado. O perímetro também foi normalizado pelo perímetro inicial de cada esferoide; (C) Consumo de glicose presente no meio RPMI ( $4,5 \text{ mg mL}^{-1}$  de glicose inicial). Para esse estudo foi utilizado um  $N=80$  esferoides, para cada fármaco testado e o ensaio foi realizado por 180 min. ANOVA  $p < 0,05$  não apresentou diferença estatística para as condições testadas.

É possível observar que a queda da viabilidade (por meio das áreas em verde) (Figura 58A) na concentração de  $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ , ao fim do tempo 180 min, foi de 25 % para a DOX, e de 13% para o PXT. A análise da diminuição dos perímetros dos esferoides ( $P/P_0$ ) (Figura 58B), não apresentaram uma diminuição significativa. Sendo a diminuição

para PXT de 3%, quando comparado com o perímetro inicial e no caso da DOX houve uma diminuição de 8%. Aqui fica uma ressalva que, a análise do perímetro ( $P/P_0$ ), só pode ser validada uma vez que é analisada em conjunto a viabilidade dos esferoides. Pois em muitos casos, a diminuição do perímetro não é ocasionada pela perda da viabilidade dos esferoides, mas devido a compactação do sistema que leva a diminuição dos perímetros dos esferoides.

Não houve alterações significativas da concentração de glicose presente no meio de cultivo ( $4,5 \text{ mg. mL}^{-1}$ ), levando a crer que houve uma mudança no metabolismo celular na presença dos fármacos (Figura 58C). Esses dados ficam mais evidentes observando os dados de consumo de glicose para as células tratadas com os fármacos, principalmente as células tratadas com DOX. A análise da glicose presente no meio de cultivo ao final dos ensaios (180 min), apresentou concentrações de  $4,2$  e  $4,0 \text{ mg. mL}^{-1}$  para DOX e PXT respectivamente; enquanto a concentração de glicose para o controle foi de  $3,2$ .

É notável que o efeito da DOX nos esferoides é mais eficaz que o efeito do PXT para o mesmo tempo (180 min). Se observamos os resultados obtidos no capítulo anterior, onde foram testados os mesmos fármacos, no mesmo período de tempo, o fármaco PXT atuava na queda da viabilidade celular em concentrações menores, quando comparado ao fármaco DOX, no entanto, as células estavam isoladas uma das outras, diferentemente das células apresentadas neste capítulo, que se encontram na conformação de esferoides.

Uma hipótese, é que as células MCF-7 na quando se agrupam e formam os esferoides, tendem a se rearranjar de forma que o citoesqueleto fique na parte mais interna do esferoide (Figura 54 B), formando o lume, enquanto o núcleo permanece na parte mais externa. Como o mecanismo de ação do PXT é nos microtúbulos, ou seja, age diretamente no citoesqueleto da célula, nessa conformação, a difusão do fármaco é dificultada, pois além da conformação há a resistência do meio (matriz extracelular). No caso da DOX, por agir diretamente no DNA presente no núcleo a difusão, nesse caso, é facilitada em comparação ao PXT.

Esse tipo de comportamento foi observado por Chen e colaboradores (2015). Os autores testaram os fármacos PXT e DOX (de forma individual e em microfluídica) em esferoides de células de câncer de fígado (HepG2), em células de câncer de mama (T47D)

e esferoides de células de câncer de cólon (HCT116). Os autores marcaram os esferoides com o marcador *Live and Dead*, e para todos os esferoides foram testadas três concentrações de cada um dos fármacos (0,1 0,5 e 1  $\mu\text{M}$ ). por 24h. Os autores observaram que todos os esferoides, na presença de DOX nas concentrações de 0,5 e 1  $\mu\text{M}$ , tiveram uma grande diminuição da viabilidade (áreas vermelhas/ laranjas nos esferoides).

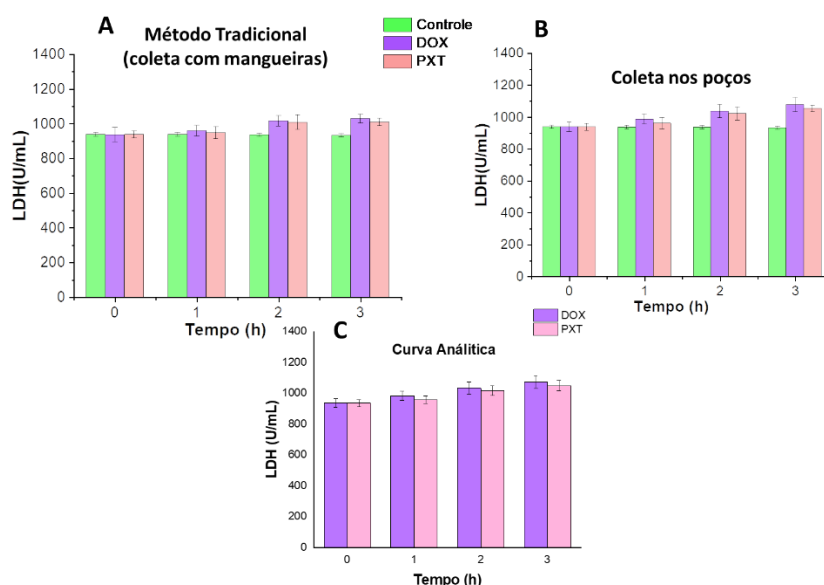
Para o caso dos ensaios utilizando o fármaco PXT, foi possível observar o efeito da diminuição da viabilidade apenas nos esferoides de células de câncer de mama e nos esferoides de células de câncer de fígado. E também o efeito da queda da viabilidade, só foi observado na concentração de 1  $\mu\text{M}$ , e em pequenas áreas. No caso dos esferoides de câncer de cólon, houve resistência ao PXT, em todas as concentrações testadas. Vale ressaltar, que há também uma relação entre o tamanho do esferoides e o a resistência ao fármaco; isso deve-se a pressão do fluido intersticial, que dificulta a penetração da droga nos tumores (NAKASONE et al., 2012; CHEN et al., 2015).

#### **6.2.4. Análise comparativa da concentração de LDH utilizando a técnica de coleta por tubos e em poços**

A ideia da criação dos poços ao final dos canais do microdispositivo teve como objetivo principal facilitar a coleta das amostras para a análise do LDH e proporcionar a reação em tempo real. Assim, foram criados os poços de forma a não comprometer a geometria já estabelecida do microdispositivo. O microdispositivo permite coletar amostras dos poços a cada 30/60 min para análises.

Para melhorar a reação entre a enzima e o reagente, os poços foram tratados com uma solução de poli L-lisina 0,1%). Para compreender como a poli -L-lisina auxilia a reação, primeiramente deve-se compreender o princípio do reagente enzimático. Durante a reação entre o NAD ( Dinucleótido de nicotinamida e adenina, coenzima presente no ciclo de Krebs) com a enzima lactato, o NAD é reduzido transformando em NADH+ promovendo o turvamento da solução, quanto maior for a liberação e lactato esse turvamento será mais acentuado. O pré-tratamento nos poços com a poli L-lisina, atua imobilizando as moléculas de NAD presente no reagente minimizando interferências na análise. Esses tratamento foi aplicado em trabalhos de sensores, que utilizam eletrodos para quantificar NADH (MIZUTANI et al., 2000).

No entanto, essa técnica nunca tinha sido empregada em microdispositivos. Dessa forma, o tratamento com poli L- lisina permite que cada molécula de NAD reaja apenas com uma enzima lactato, apresentando resultados quantitativos mais próximos ao real. Para verificar a eficácia dos poços, foi comparado a quantificação e lactato retirando as amostras dos micropoços e a coleta por mangueira, como controle, foi construída uma curva analítica utilizando apenas a enzima lactato (proveniente do kit enzimático) em diferentes concentrações e juntamente com as diferentes concentrações de fármacos testados. Na Figura 59 é possível verificar os valores obtidos da quantificação de lactato desidrogenase utilizando as duas técnicas de coletas por 180 min.



**Figura 59:**Quantificação da enzima lactato desidrogenase em três diferentes condições (sem fármaco(controle), fármaco paclitaxel e doxorubicina). Os ensaios foram realizados utilizando (A) a técnica de coleta tradicional (por mangueiras) e (B) os poços presentes no microdispositivo. Foram coletando a enzima excretada pelos esferoides de MCF-7 a cada 1 h. Para a técnica utilizando mangueiras; foi coletado a enzima em tubos e adicionado o reagente, para após ser mensurado em leitores de placa (C) Curva analítica de LDH. No caso utilizado da coleta por poços, o reagente foi previamente adicionado nos poços, reagindo em tempo real com o resíduo produzido pelas células. Os valores de quantidade de enzima utilizando as duas técnicas estão representados no gráfico em U/mL (unidade de enzima por e mililitros). ANOVA  $p < 0,05$ .

Apesar das diferenças de valores apresentadas nas Figura 59 A e 59 B, serem pequenas e se tratando de microfluídica, que opera utilizando pequenos volumes (na

ordem de microlitros), a análise estatística efetuada, não apresentou diferenças significativas (ANOVA e teste de Tukey com intervalo de confiança de 95%).

Em termos de comparação das duas técnicas, avaliando os resultados obtidos pela técnica de coleta por poços e pela técnica de coleta em tubos, em termos percentuais, é visível a diferença na concentração de LDH apresentada em cada uma das condições. Como pode ser observado na Tabela 4.

**Tabela 4:** Análise comparativa em % da diferença de valores utilizando a técnica de coleta por tubos e utilizando a coleta diretamente dos poços, em comparação a curva analítica (controle). A Análise foi realizada para os dois fármacos nos 4 tempos (0-3h), ANOVA  $P < 0,05$  e teste de Tukey com intervalo de confiança de 95%.

| Tempo (h) | Diferença na concentração de LDH identificada utilizando a coleta nos poços e a metodologia de coleta (%) * Comparação com a curva analítica |            |               |                       |            |               |
|-----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|---------------|-----------------------|------------|---------------|
|           | Coleta nos poços                                                                                                                             |            |               | Coleta por mangueiras |            |               |
|           | Controle                                                                                                                                     | Paclitaxel | Doxorrubicina | Controle              | Paclitaxel | Doxorrubicina |
| 0         | 1                                                                                                                                            | 2          | 1             | 0,1                   | 1          | 1             |
| 1         | 1                                                                                                                                            | 3          | 3             | 0,64                  | 11         | 25            |
| 2         | 0                                                                                                                                            | 3          | 3             | 1,09                  | 10         | 18            |
| 3         | 0                                                                                                                                            | 5          | 6             | 1,2                   | 41         | 44            |

Os valores calculados para análise coletando diretamente do poço e para a coleta da forma tradicional (com mangueiras), após 3h de análise apresentaram uma diferença entre os valores de 44% para DOX e 41% PXT. No caso do controle a diferença foi de 1,2%, não sendo significativa.

Para análises longas (tempos superiores a 3 h-180 min), o erro entre a quantidade real de enzimas e a mensuradas, pode ser perpetuado, pois a análise é acumulativa, ou seja, a quantidade de enzima é acumulativa ao longo do tempo, propagando o erro.

Essas diferenças, se tratando de microfluídica os valores apresentados, é muito significativa, devido ao volume produzido em microfluídica, como já elucidado acima, a técnica trabalha com pequenos volumes, portanto há menos quantidade de enzimas presente, nesse caso, fazendo uma analogia com um sistema em *bulk* (reator de bancada), a perda de 1  $\mu\text{L}$  em um sistema que o volume final será de 1 mL não é significativo,

diferente em um sistema que (i) opera fluxo contínuo e (ii) que o volume final será 5 $\mu$ L em cada um dos poços.

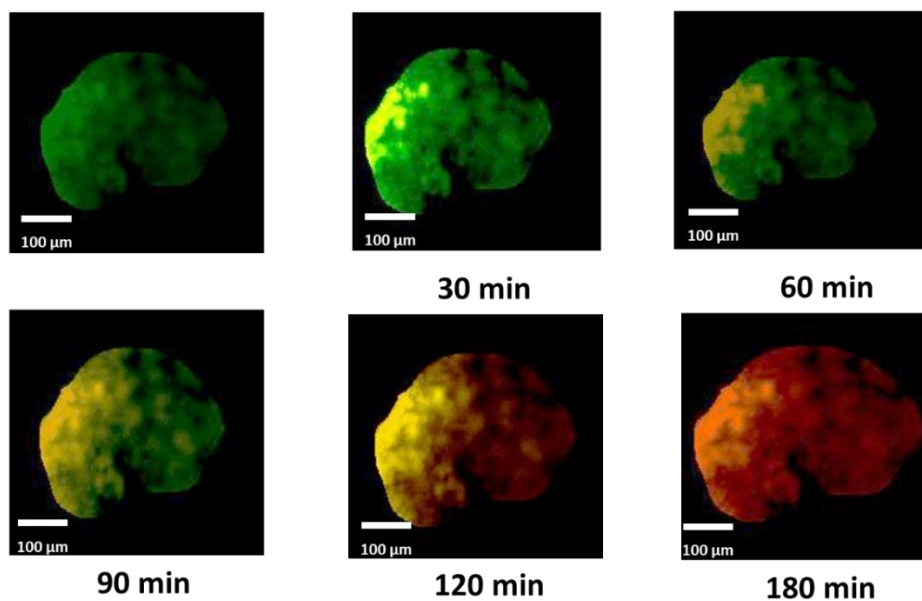
O protótipo que apresenta a coleta utilizando poços é mais confiável, pois diminui as perdas. E, por se tratarem de poços isolados no final de cada um dos canais, também não ocorre o acúmulo de LDH proveniente dos 4 módulos, que podem interferir no resultado final.

#### **6.2.5 Análise dos esferoides utilizando DOX e PXT simultaneamente**

Após da análise individual dos fármacos (PXT e DOX), foi avaliado o efeito combinado destes fármacos nos esferoides. Para isso, foi utilizada a mesma estratégia utilizada no Capítulo 3. Utilizando o princípio da análise isobolográfica, foram testadas duas condições diferentes e avaliado o efeito das combinações dos fármacos nos esferoides. Para as escolhas das concentrações, como não foi possível obter o IC<sub>50</sub> de cada um dos fármacos na forma individual, foram escolhidas concentrações de cada um dos fármacos de forma teórica, de forma que o índice combinatório (IC) dos fármacos não ultrapassassem a razão = 1 (IC<1).

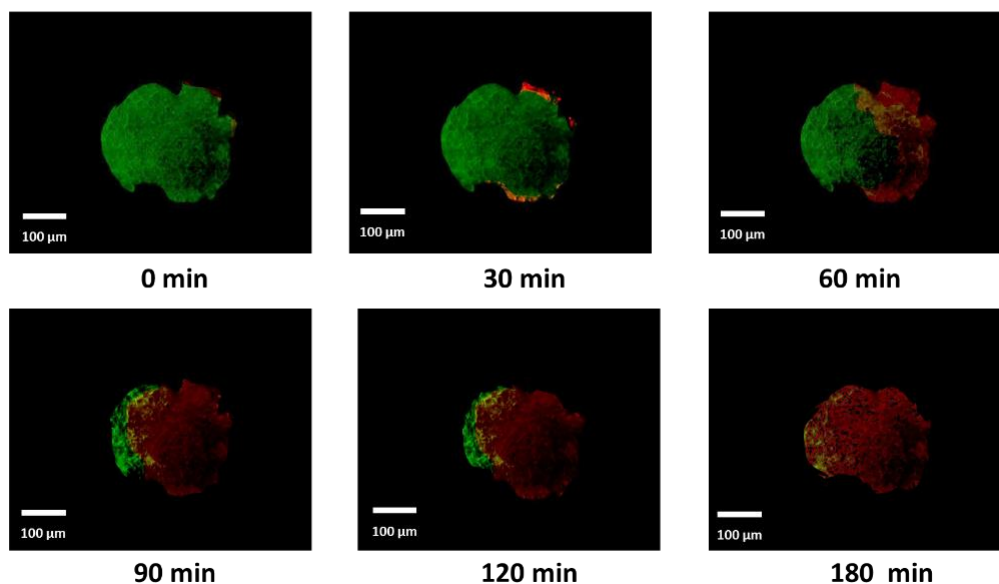
Os esferoides foram marcados novamente com o marcador *Live and Dead*, e em cada uma das entradas foram escoados a combinação dos fármacos desejada. Vale ressaltar que não houve a geração do gradiente difusivo no ensaio, pois a área ocupada pelos esferoides é muito maior que as áreas delimitadas para cada concentração gerada. Os ensaios foram realizados por 180 min e os resultados podem ser verificados nas Figuras 60 e 61.

### DOX 0,050+PXT 0,025 mg/mL



**Figura 60:** Microscopias de fluorescência de esferoides marcados com *Live and Dead* mantidos em microchip sob perfusão na presença de 0,050 DOX + 0,025 PXT. As áreas em verde representam as células viáveis e as áreas em vermelho as células não-viáveis. Os ensaios ocorreram por 180min, a 37°C, 5 % de CO<sub>2</sub> e vazão de 7 µL.min<sup>-1</sup>. Barra de escala 100µm.

### DOX 0,070+PXT 0,025 mg/mL

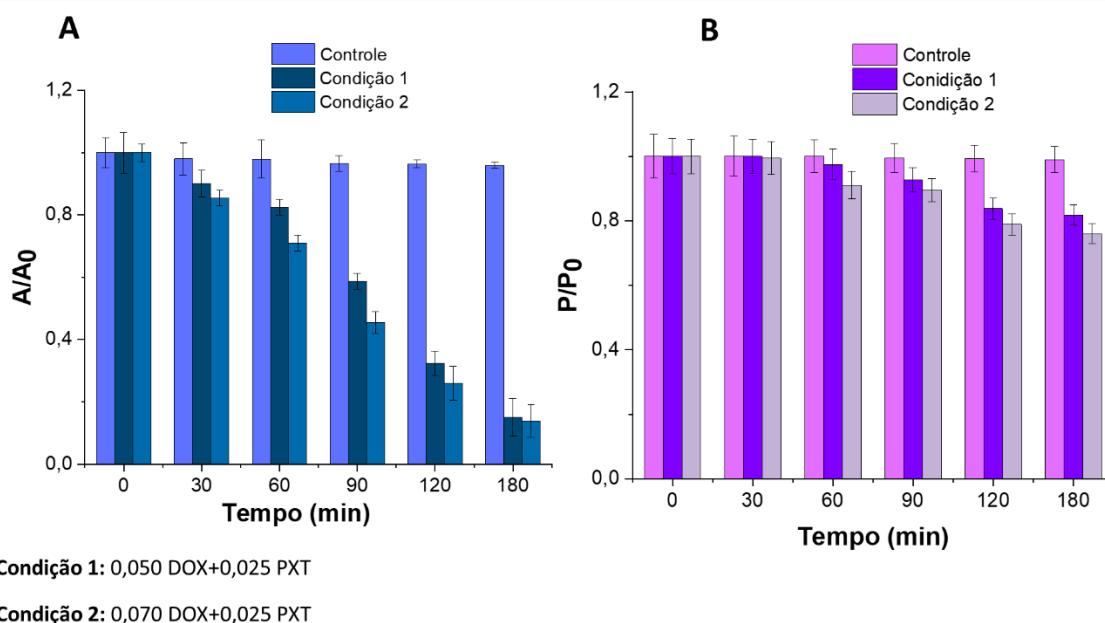


**Figura 61:**Microscopias de fluorescência de esferoides marcados com *Live and Dead* mantidos em microchip sob perfusão na presença de 0,070 DOX + 0,025 PXT. As áreas em verde representam as células

viáveis e as áreas em vermelho as células não-viáveis. Os ensaios ocorreram por 180min, a 37°C, 5 % de CO<sup>2</sup> e vazão de 7  $\mu\text{L}.\text{min}^{-1}$ . Barra de escala 100 $\mu\text{m}$ .

Na Figura 60 é possível verificar que na condição 1 (0,05 de DOX e 0,025 - IC=0,75) de PXT tem efeito potencializado quando comparado aos efeitos dos fármacos avaliados na forma individual. Avaliando a diminuição das áreas com a tonalidade verde (~80%), na superfície dos esferoides ( $A/A_0$ ), ocorre apenas no tempo de 120 min, onde é possível observar um aumento das áreas em vermelho e amareladas.

Na Figura 61, na condição2 (0,070 de DOX e 0,025 de PXT (IC=0,95)) em 90 min ocorreu uma diminuição de ~85% das áreas em verdes nos esferoides. Em 180, há uma queda drástica da viabilidade dos esferoides; isso pode ser observado devido a tonalidade vermelha por toda a superfície dos esferoides. Para quantificar a viabilidade em cada uma das condições testadas, foram calculadas o perfil de viabilidade (Figura 62A) e o perímetro dos esferoides (Figura 62B). Para cada ensaio, foi utilizando cerca de 60 esferoides (N=60).

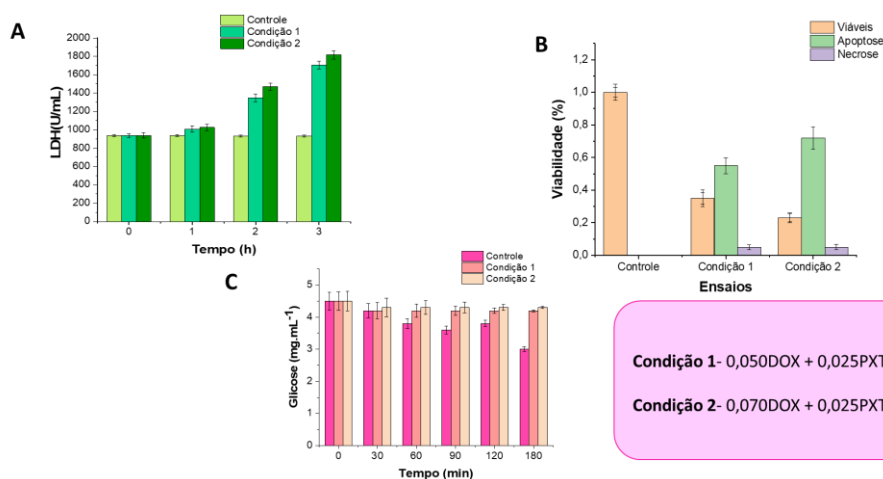


**Figura 62:** Análise de viabilidade. (A) Perfil do número de células viáveis ao longo do tempo. Para quantificar, foi utilizado o probe *Live and Dead*, avaliando apenas as áreas em verde ao longo do tempo. Os resultados obtidos em cada tempo (t), foi normalizado pela área inicial ( $A_0$ ). (B) Perímetro médio dos esferoides para cada condição testada ao longo do tempo. O perímetro também foi normalizado pelo

perímetro inicial de cada esferoide. Para esse estudo foi utilizado um N=60 esferoides, para cada condição testada. ANOVA  $p < 0,05$  não apresentou diferença estatística para as condições testadas.

Na Figura 62A, é possível verificar que na condição 2, ao fim de 180 min, apresentou viabilidade de 10%, enquanto na condição 1 a viabilidade foi de 17%. Esse comportamento também pode ser observado na diminuição do perímetro dos esferoides (Figura 62B), onde a diminuição foi de ~10% para Condição 2, e de 14% para condição 1.

Além disso, ao final de todo o processo, também foi possível verificar a quantidade de LDH liberado, avaliar o mecanismo de morte celular por meio do ensaio de AnexinaV/PI e o consumo de glicose presente no meio (Figuras 63)



**Figura 63:** (A) Perfil da liberação de lactato (LDH); (B) Mecanismo de morte celular (apoptose/ necrose). Para esse ensaio foi utilizado o probe; AnexinaV/PI (C) Análise do consumo de glicose presente no meio de cultivo (RPMI 4,5 mg.mL<sup>-1</sup>). O N para essa análise foi de 60 esferoides para cada uma das condições testadas. ANOVA  $p < 0,05$  não apresentou diferença estatística entre os ensaios.

É possível verificar que a quantidade de LDH liberada (Figura 63A) é maior na condição 2 que na condição 1. Apesar na 3 hora essa diferença de LDH liberado para as duas condições seja mais acentuada, não há diferenças estatísticas (ANOVA,  $p < 0,05$ ).

O ensaio de mecanismo de morte celular (Figura 63B), na condição 2 há mais células apoptóticas que na condição 1. No entanto, em termos de células necrosadas, as duas condições testadas apresentaram número de células semelhante por área. Além disso o consumo de glicose no meio de cultivo (Figura 63C) foi praticamente nula. A glicose resultante no meio foi de 4,3 mg.mL<sup>-1</sup> para ambos os ensaios, quando comparado com controle, que obteve 3,0 mg.mL<sup>-1</sup> ao final do processo (180 min).

Vale ressaltar, que devido as características apresentadas pelos esferoides, eles possuem uma confiabilidade maior, quando comparado aos sistemas 2D; principalmente para ensaios (*in vitro*) pré-clínicos de testes de medicamentos (PATRA et al., 2016; MULHOLLAND et al., 2018).

Os ensaios utilizando a combinação dos fármacos PXT e DOX, apresentaram resultados promissores, uma vez que foi possível observar a diminuição das áreas em verde de cada esferoide ao longo do tempo. O mesmo resultado não foi observado nos ensaios com os fármacos na forma isolada, mesmo utilizando concentrações maiores ( $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$  para ambos os fármacos) que as concentrações utilizadas nos ensaios dos fármacos combinados.

O número total de esferoides no início do ensaio foi de 60 esferoides ( $N=60$ ). Porém, ao final do tratamento na condição 1 foram observados um  $N=40$  esferoides e para a condição 2, o  $N$  final foi de 33 esferoides. Uma hipótese, como os esferoides não possuem tamanhos uniformes, alguns esferoides menores, podem ter perdido a conformação ao longo do tempo ao tratamento, uma vez que a difusividade do fármaco está diretamente atrelada ao tamanho do esferoide (EILENBERGER et al., 2021).

O consumo de glicose também serve como um indicador de viabilidade e celular, uma vez que as células viáveis consomem glicose do meio para se manterem ativas e se multiplicaram. Uma vez que isso não ocorre, pode-se inferir que, há uma queda na viabilidade ou no metabolismo de glicose. Nesse caso, o tratamento com os fármacos, ocasionou a queda da viabilidade celular, que por sua vez afeta diretamente na capacidade das células metabolizar glicose para manter o funcionamento e a divisão celular (ZHENG et al., 2012).

Yang et al., (2019) desenvolveram um microdispositivo para *drug screening*, utilizando esferoides de MCF-7 e L929 (células provenientes de tecido conjuntivo de camundongos). Os autores testaram os fármacos PXT e DOX de forma separada e na forma combinada. Os autores observaram uma resistência dos esferoides a ação dos fármacos testados individualmente, mesmo em concentrações elevadas ( $500 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) para cada fármaco. No entanto, na forma combinada, utilizando concentrações que somadas são iguais  $50 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$  ( $10 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$  de PXT+  $40 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$  de DOX), os esferoides

de ambas as células (MCF-7 e L929), não apresentaram resistência a ação do fármaco, obtendo uma queda da viabilidade 3X maior que os ensaios com os fármacos individuais.

Assim como Yang e colaboradores, diferentes trabalhos utilizando esferoides como modelos *in vitro*, observaram a diminuição da viabilidade, mudança no metabolismo celular e na conformação dos agregados celulares (KWAPISZEWSKA et al., 2014b; DADGAR et al., 2020; LI et al., 2021).

A observação desses resultados foi possível devido a utilização de dispositivos microfluídicos. Uma vez que, os microdispositivos possibilitam a criação de um ambiente 3D, que reflete de forma similar a realidade em ambientes fisiológicos.

Brodeur e colaboradores (2021), compararam a resposta celular de esferoides de células de câncer de ovário com tumor de ovário xenotransplantados (processo de transferir cirurgicamente um tecido de uma espécie para outra distinta) em camundongos. Para esses ensaios, foram testados os esferoides em ambiente microfluídico, onde os esferoides foram circundados por uma matriz extracelular. Para verificar a sensibilidade dos tumores (esferoides e em camundongos), foram utilizadas diferentes concentrações do fármaco carboplatina, bastante comum para tratamento de câncer de ovário. Os autores compararam os resultados obtidos com os esferoides, com células 2D de câncer de ovário e com o tumor em camundongos e verificaram que os esferoides em microfluídica, tinham respostas muito similares ao fármaco, que as repostas obtidas em camundongos, uma vez que os esferoides em microfluídica oferecem um ambiente 3D propício para o estudo de fármacos de forma confiável e com custo menos elevado, se comparado com modelos animais (BRODEUR et al., 2021).

O microdispositivo proposto, quando comparado aos microdispositivos citados acima, apresenta resultados similares em termos de metabolismo e comportamento dos esferoides, no entanto, com a vantagem de possuir a selagem reversível o que possibilita a utilização mais de uma vez, além dos 4 módulos individuais, que permitem testar 4 condições diferentes simultaneamente.

### 6.3 Conclusão

O microdispositivo desenvolvido permite estudar o comportamento de sistemas celulares mais complexos, como esferoides, possibilitando realizar análises morfológicas, de viabilidade, análise combinatória de fármacos e análise do metabolismo celular em condições dinâmicas e principalmente em um único ensaio.

Além disso, a inserção dos poços nos finais dos canais do microdispositivo, mostrou-se eficaz, permitindo que ocorra a reação da enzima LDH com o reagente enzimático. Também possibilitou diminuir as perdas por diluição da enzima LDH, obtendo resultados mais acurados.

Foi possível verificar o comportamento dos esferoides em frente a diferentes concentrações de DOX e PXT. Tanto com os fármacos na forma individual, quanto na forma combinada.

As células na conformação de esferoides, dificultam a difusão dos fármacos, sendo necessárias concentrações maiores de cada um dos fármacos para obter a queda da viabilidade celular. Avaliando os fármacos na forma combinada, as condições 1 e 2 obtiveram bons resultados, quando comparado as concentrações dos fármacos individualmente. Isso pode ser observado também pela quantidade de LDH liberada em cada uma das condições analisadas e pela diminuição do perímetro dos esferoides.

O microdispositivo permite o estudo das células em tempo real, tanto de sistemas simples quanto sistema mais complexos (esferoides), possibilitando obter dados que auxiliam no estudo do comportamento, da morfologia e do metabolismo celular. Além disso, possibilita diferentes análises simultaneamente e a reutilização do microdispositivo. Dessa forma, foi possível utilizando um único microdispositivo, criar uma plataforma versátil, que comporta sistemas *in vitro* complexos, obtendo dados confiáveis e próximo ao sistema *in vivo*.

---

## Capítulo 7-Conclusões Finais e Perspectivas Futuras

---

### 7.1 Conclusões Finais

O presente projeto contemplou a criação de um microdispositivo nacional, totalmente inovador com selagem reversível, que possibilitou o estudo do comportamento celular em diferentes condições. Perante os dados apresentados nesta tese, é possível afirmar que:

- O microdispositivo permite o estudo do comportamento celular na presença de diferentes concentrações de fármaco, os módulos e as replicatas permitiram a realização de diferentes testes em um único experimento;
- Dentre as principais limitações do microdispositivo é a queda de viabilidade para períodos superiores a 24h, devido a evaporação do meio. Uma possível e fácil solução para minimizar a evaporação do meio é o desenvolvimento de micro reservatórios acoplados nas entradas do microdispositivo ou ainda a troca de meio a cada 12h;
- O gradiente de concentração de difusão linear, que possibilitou avaliar o comportamento celular em diferentes concentrações do fármaco e também possibilitou testar dois fármacos na forma combinada, sem a ocorrência de reações químicas. No entanto, analisando criticamente o gradiente de concentração é apenas local e no momento da infusão dos fármacos, não levando em consideração a meia vida do fármaco no organismo, para isso são necessários testes com tempos superiores a 3h, para verificar o comportamento celular além do momento da aplicação do fármaco.
- O gradiente de concentração é confiável para ensaios até 180 min, uma vez que o efeito da senescência celular neste período de tempo foi ocasionado predominantemente, pela concentração e a ação dos fármacos e não por uma possível comunicação celular. Além disso, a utilização da agarose limitou a

comunicação célula-célula, não interferindo na análise. Deve-se verificar o comportamento celular para tempos maiores de 3h, uma vez solucionada o problema da viabilidade celular;

- O microdispositivo utilizou apenas uma linhagem celular (MCF-7), que possibilitou obter uma gama de dado, no entanto, se faz necessário testes com outra as linhagens principalmente linhagens que possam se diferenciar para verificar o comportamento de diferentes células e em diferentes condições no microdispositivo;
- A selagem reversível do microdispositivo permitiu a realização de análises mais complexas (*e.g.*MEV). E além disso microdispositivo pode ser reutilizado sem perder suas funcionalidades.
- A criação dos poços nos finais dos canais do microdispositivo, foi eficiente, permitindo que ocorra a reação da enzima LDH com o reagente enzimático. Também possibilitou diminuir as perdas da enzima LDH, obtendo resultados mais precisos;
- O microdispositivo permitiu avaliar o comportamento de sistemas mais complexos, como os esferoides, em frente a diferentes concentrações e combinações de fármacos, obtendo dados próximos ao relatado na literatura;
- Em comparação com os métodos tradicionais, o microdispositivo utiliza pouco consumo de reagente e amostras, diminuindo os custos de operação. O dispositivo também permite obter respostas *in vitro*, mais confiáveis, já que atua de forma dinâmica. O microdispositivo pode auxiliar como uma etapa para o desenvolvimento de fármacos, eliminando candidatos não promissores rapidamente;
- O fato do microdispositivo se enquadra dentro dos objetivos da ONU para um consumo e produção sustentável, por ser reutilizável o microdispositivo auxilia a diminuir a produção de resíduos, além de ser uma tecnologia 100% nacional, criada e desenvolvida no país, o que permite escalonar o projeto para criação de futuras empresas de base tecnológicas.

## 7.2 Perspectivas Futuras

Diante do trabalho apresentado há uma série de melhorias que deixariam o microdispositivo mais funcional e, facilitaria as análises. Como exemplos de melhorias pode-se citar a diminuição das geometrias dos microcanais e microcâmaras, a criação de um sistema de reservatório para minimizar a evaporação do meio de cultivo. Além de empregar e melhorar algumas técnicas de fabricação e a realização de alguns ensaios. No âmbito geral podemos listar detalhadamente:

- Melhorar o método de fabricação do microdispositivo, como substituir a tampa de vidro por outro sistema que permita acoplar de forma mais fácil a mangueiras. Criar um sistema que possibilite o escoamento sem a utilização de bombas seringas;
- Quanto ao material utilizado, seria interessante fazer análises de microscopia de força atômica (AFM), para quantificar as ranhuras presente no PDMS<sub>LAM</sub>;
- Utilizar métodos de fabricação como a xurografia para fabricar o microdispositivo;
- Realizar análise de microscopia de força atômica (AFM), para quantificar as ranhuras presente no microdispositivo, também realizar análises de tração e de adesão em outros materiais além do vidro;
- Realizar tratamentos que possibilite o desenvolvimento dos esferoides dentro do microdispositivo;
- Testar o microdispositivo para organoides e esferoides proveniente de outras células, além de sistemas co-culturas;
- Fazer ensaios, explorando outros fármacos e outras células, além de refazer algumas análises utilizando anticorpos específicos para compreender o mecanismo de morte celular;
- Além disso, também deve ser estudado o gradiente duplo funcionará da mesma forma para outros medicamentos e/ou reagentes, e verificar se caso ocorra reação entre os medicamentos e/ou reagentes, como isso afeta o gradiente de concentração;

- Realizar ensaios utilizando linhagens provenientes de pacientes com câncer (biópsia) e estimar a concentração do fármaco para cada paciente;
- Realizar ensaios de transfecção, no microdispositivo projetado, utilizando nanopartículas/ nanocreadores em células 2 e 3D.

---

## Capítulo 8- Referências Bibliográficas

---

1. ABBAS, Y. et al. A microfluidics assay to study invasion of human placental trophoblast cells. **Journal of the Royal Society Interface**, v. 14, n. 130, 2017.
2. ABHYANKAR, V. V. et al. A reversibly sealed, easy access, modular (SEAM) microfluidic architecture to establish in vitro tissue interfaces. **PLoS ONE**, v. 11, n. 5, p. 1–20, 2016.
3. ARMSTRONG, J.; DASS, C. R. Doxorubicin Action on Mitochondria: Relevance to Osteosarcoma Therapy? **Current Drug Targets**, v. 19, n. 5, p. 432–438, 2018.
4. ATENCIA, J.; BEEBE, D. J. Controlled microfluidic interfaces. **Nature**, v. 437, n. 7059, p. 648–55, 29 set. 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16193039>>. Acesso em: 15 set. 2015.
5. ATENCIA, J.; COOKSEY, G. a; LOCASCIO, L. E. A robust diffusion-based gradient generator for dynamic cell assays. **Lab on a chip**, v. 12, n. 2, p. 309–316, 21 jan. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22113489>>. Acesso em: 10 nov. 2015.
6. ATENCIA, J.; MORROW, J.; LOCASCIO, L. E. The microfluidic palette: a diffusive gradient generator with spatio-temporal control. **Lab on a chip**, v. 9, n. 18, p. 2707–14, 21 set. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19704987>>. Acesso em: 22 ago. 2014.
7. BANG, S. et al. Brain-on-a-chip: A history of development and future perspective. **Biomicrofluidics**, v. 13, n. 5, p. 1–7, 2019.
8. BARKEFORS, I. et al. Endothelial Cell Migration in Stable Gradients of Vascular Endothelial Growth Factor A and Fibroblast Growth Factor 2: Effects on Chemotaxis and Chemokinesis. **The Journal of biological chemistry**, v. 283, n. 20, p. 13905–13912, maio 2008.
9. BEN-YAKAR, A. High-content and high-throughput in vivo drug screening platforms using microfluidics. **Assay and Drug Development Technologies**, v. 17,

- n. 1, p. 8–13, 2019.
10. BERRY, S. B. et al. Upgrading well plates using open microfluidic patterning. **Lab on a Chip**, p. 1–12, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1039/C7LC00878C>>.
  11. BLUNDELL, T. **Descobrir novos fármacos requer união de metodologias experimentais e computacionais.** Disponível em: <<http://agencia.fapesp.br/descobrir-novos-farmacos-requer-uniao-de-metodologias-experimentais-e-computacionais/15425/>>. Acesso em: 15 jul. 2020.
  12. BOSQ, N. et al. Melt and glass crystallization of PDMS and PDMS silica nanocomposites. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 16, n. 17, p. 7830–7840, 2014.
  13. BOXBERGER, H. J.; MEYER, T. F. A new method for the 3-D in vitro growth of human RT112bladder carcinoma cells using the alginate culture technique. **Biology of the Cell**, v. 82, n. 2–3, p. 109–119, 1994.
  14. BRASIL.; MINISTÉRIO DA SAÚDE; DATASUS. **Mortalidade Câncer no BrasilBRASIL. Ministério da Saúde DataSUS.** [s.l: s.n.].
  15. BRAY, F. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394–424, 2018.
  16. BRESCIANI, G. et al. Evaluation of Spheroid 3D Culture Methods to Study a Pancreatic Neuroendocrine Neoplasm Cell Line. **Frontiers in Endocrinology**, v. 10, n. October, p. 1–10, 2019.
  17. BRODEUR, M. N. et al. Carboplatin response in preclinical models for ovarian cancer : comparison of 2D monolayers , spheroids , ex vivo tumors and *in vivo* models. **Scientific Reports**, v. 11, p. 1–12, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41598-021-97434-w>>.
  18. BUKOWSKI, K.; KCIUK, M.; KONTEK, R. Mechanisms of multidrug resistance in cancer chemotherapy1. Bukowski K, Kciuk M, Kontek R. Mechanisms of multidrug resistance in cancer chemotherapy. *Int J Mol Sci.* 2020;21(9). doi:10.3390/ijms21093233. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 9, 2020.

19. BURRIDGE, P. W. et al. Human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes recapitulate the predilection of breast cancer patients to doxorubicin-induced cardiotoxicity. **Nature Medicine**, v. 22, n. 5, p. 547–556, 2016.
20. BUSSADOR DO AMARAL, J.; SHINITI URABAYASHI, M.; MARIA MACHADO-SANTELLI, G. Cell death and lumen formation in spheroids of MCF-7 cells. **Cell Biology International**, v. 34, n. 3, p. 267–274, 2010.
21. CANN, O. These are the top 10 emerging technologies of 2016 | World Economic Forum. **World Economic Forum**, p. 1–9, 2016. Disponível em: <<https://www.weforum.org/agenda/2016/06/top-10-emerging-technologies-2016/>>.
22. CARDOSO, S.; SILVERIO, V. **Introduction to microfabrication techniques for microfluidics devices**. [s.l.] Elsevier Inc., 2021.
23. CARVALHO, B. G. et al. Recent advances in co-delivery nanosystems for synergistic action in cancer treatment. **J. Mater. Chem. B**, 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1039/D0TB02168G>>.
24. CHANG, H. C. et al. Multilayer architecture microfluidic network array for combinatorial drug testing on 3D-cultured cells. **Biofabrication**, v. 11, n. 3, 2019.
25. CHEN, J. et al. 3D printed microfluidic devices for circulating tumor cells (CTCs) isolation. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 150, p. 111900, 2020a. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.111900>>.
26. CHEN, P. et al. A review on microfluidics manipulation of the extracellular chemical microenvironment and its emerging application to cell analysis. **Analytica Chimica Acta**, v. 1125, p. 94–113, 2020b. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.05.065>>.
27. CHEN, X. et al. High-throughput generation of a concentration gradient on open arrays by serial and parallel dilution for drug testing and screening. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 305, n. August 2019, p. 127487, 2020c. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.snb.2019.127487>>.
28. CHEN, Y. et al. Drug cytotoxicity and signaling pathway analysis with three-dimensional tumor spheroids in a microwell-based microfluidic chip for drug screening. **Analytica Chimica Acta**, v. 898, p. 85–92, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2015.10.006>>.

29. CHEN, Z. et al. Arbitrarily Accessible 3D Microfluidic Device for Combinatorial High-Throughput Drug Screening Zhuofa. **Sensors (Switzerland)**, v. 16, p. 1–12, 2016.
30. CHENG, Y. et al. Enhanced light outcoupling in a thin film by texturing meshed surfaces. **APPLIED PHYSICS LETTERS**, v. 90, p. 9–11, 2007.
31. CHITCHOLTAN, K.; SYKES, P. H.; EVANS, J. J. The Resistance of Intracellular Mediators to Doxorubicin and Cisplatin Are Distinct in 3D and 2D Endometrial Cancer. **Journal of translational medicine**, v. 10, p. 38, mar. 2012.
32. CHOI, J. H.; SANTHOSH, M.; CHOI, J. W. In vitro blood-brain barrier-integrated neurological disorder models using a microfluidic device. **Micromachines**, v. 11, n. 1, p. 1–20, 2020.
33. CHOW, W. W. Y. et al. Microfluidic channel fabrication by PDMS-interface bonding. **Smart Materials and Structures**, v. 15, n. 1, 2006.
34. CIMETTA, E. et al. Microfluidic bioreactor for dynamic regulation of early mesodermal commitment in human pluripotent stem cells. **Lab on a chip**, v. 13, n. 3, p. 355–64, 7 fev. 2013. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3535552&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 10 nov. 2015.
35. CONVERY, N.; GADEGAARD, N. 30 Years of Microfluidics. **Micro and Nano Engineering**, v. 2, n. January, p. 76–91, 2019.
36. COSTA, E. C. et al. 3D tumor spheroids: an overview on the tools and techniques used for their analysis. **Biotechnology Advances**, v. 34, n. 8, p. 1427–1441, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.11.002>>.
37. CUI, P.; WANG, S. Application of microfluidic chip technology in pharmaceutical analysis: A review. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 9, n. 4, p. 238–247, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jpha.2018.12.001>>.
38. DADGAR, N. et al. A microfluidic platform for cultivating ovarian cancer spheroids and testing their responses to chemotherapies. **Microsystems and Nanoengineering**, v. 6, n. 1, 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41378-020-00201-6>>.
39. DAS, C. K. et al. Lactate dehydrogenase A regulates autophagy and tamoxifen

- resistance in breast cancer. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1866, n. 6, p. 1004–1018, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2019.03.004>>.
40. DESCHAMPS, F. et al. Stabilization Improves Theranostic Properties of Lipiodol®-Based Emulsion During Liver Trans-arterial Chemo-embolization in a VX2 Rabbit Model. **CardioVascular and Interventional Radiology**, v. 40, n. 6, p. 907–913, 2017.
  41. DIMASI, J. A.; GRABOWSKI, H. G.; HANSEN, R. W. Innovation in the pharmaceutical industry: New estimates of R&D costs. **Journal of Health Economics**, v. 47, p. 20–33, 2016. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167629616000291>>.
  42. DOĞANER, B. A.; YAN, L. K. Q.; YOUK, H. Autocrine Signaling and Quorum Sensing: Extreme Ends of a Common Spectrum. **Trends in Cell Biology**, v. 26, n. 4, p. 262–271, 2016.
  43. DONG, R. et al. Microfluidics-Based Biomaterials and Biodevices. **Advanced Materials**, v. 31, n. 45, p. 1–18, 2019.
  44. DONG, X. et al. Doxorubicin and paclitaxel-loaded lipid-based nanoparticles overcome multidrug resistance by inhibiting P-glycoprotein and depleting ATP. **Cancer Research**, v. 69, n. 9, p. 3918–3926, 2009.
  45. DOU, J. et al. Combination Stiffness Gradient with Chemical Stimulation Directs Glioma Cell Migration on a Microfluidic Chip. **Analytical Chemistry**, v. 92, n. 1, p. 892–898, 2020.
  46. DUARTE, A. C. et al. Análise da Indústria Farmacêutica - Perspectivas e Desafios. **Núcleo de Estudos e Pesquisas da Consultoria Legislativa**, v. 183, p. 44, 2015. Disponível em: <[www.senado.leg.br/estudos%0Awww.senado.leg.br/estudos](http://www.senado.leg.br/estudos%0Awww.senado.leg.br/estudos)>.
  47. DUONG, H. H. P.; YUNG, L. Y. L. Synergistic co-delivery of doxorubicin and paclitaxel using multi-functional micelles for cancer treatment. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 454, n. 1, p. 486–495, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.06.017>>.
  48. DUVAL, K. et al. Modeling physiological events in 2D vs. 3D cell culture. **Physiology**, v. 32, n. 4, p. 266–277, 2017.

49. EDMONDSON, R. et al. Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors. **Assay and Drug Development Technologies**, v. 12, n. 4, p. 207–218, 2014.
50. EDUATI, F. et al. A microfluidics platform for combinatorial drug screening on cancer biopsies. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41467-018-04919-w>>.
51. EFFERTH, T.; VOLM, M. Multiple resistance to carcinogens and xenobiotics: P-glycoproteins as universal detoxifiers. **Archives of Toxicology**, v. 91, n. 7, p. 2515–2538, 2017.
52. EILENBERGER, C. et al. A Microfluidic Multisize Spheroid Array for Multiparametric Screening of Anticancer Drugs and Blood – Brain Barrier Transport Properties. v. 2004856, p. 1–20, 2021.
53. FANG, G. et al. Gradient-sized control of tumor spheroids on a single chip. **Lab on a Chip**, v. 19, n. 24, p. 4093–4103, 2019.
54. FANG, G. et al. Unidirectional intercellular communication on a microfluidic chip. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 175, n. September 2020, 2021.
55. FARRELL, E. et al. A comparison of the osteogenic potential of adult rat mesenchymal stem cells cultured in 2-D and on 3-D collagen glycosaminoglycan scaffolds. **Technology and Health Care**, v. 15, p. 19–31, 2007.
56. FENG, C. et al. Ratiometric co-encapsulation and co-delivery of doxorubicin and paclitaxel by tumor-targeted lipodisks for combination therapy of breast cancer. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 560, n. February, p. 191–204, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.02.009>>.
57. FENG, Y. et al. Future perspective: high-throughput construction of new ultrasensitive cytokine and virion liquid chips for high-throughput screening (HTS) of anti-inflammatory drugs or clinical diagnosis and treatment of inflammatory diseases. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 412, n. 28, p. 7685–7699, 2020.
58. FERLAY, J. et al. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. **International Journal of Cancer**, v. 144, n. 8, p. 1941–1953, 2019.

59. FERRAZ, M. et al. Mimicking the bovine oviduct in a microfluidic device for advanced embryo in vitro culture systems. **21st International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences, MicroTAS 2017**, v. 1, p. 1047–1048, 2020.
60. FLONT, M.; JASTRZEBSKA, E.; BRZÓZKA, Z. Synergistic effect of the combination therapy on ovarian cancer cells under microfluidic conditions. **Analytica Chimica Acta**, v. 1100, p. 138–148, 2020. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003267019314102>>.
61. FONCY, J. et al. Microelectronic Engineering Reversible magnetic clamp of a microfluidic interface for the seric detection of food allergies on allergen microarrays. **MEE**, v. 158, p. 16–21, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.mee.2016.03.005>>.
62. GAO, W. et al. Transferrin receptor-targeted pH-sensitive micellar system for diminution of drug resistance and targetable delivery in multidrug-resistant breast cancer. **International Journal of Nanomedicine**, v. 12, p. 1047–1064, 2017.
63. GARCÍA, S. et al. Generation of stable orthogonal gradients of chemical concentration and substrate stiffness in a microfluidic device. **Lab on a Chip**, v. 15, n. 12, p. 2606–2614, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1039/C5LC00140D>>.
64. GERAGHTY, R. J. et al. Guidelines for the use of cell lines in biomedical research. **British journal of cancer**, v. 111, n. 6, p. 1021–1046, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/bjc.2014.166>>.
65. GERLINGER, M. et al. Intratumor Heterogeneity and Branched Evolution Revealed by Multiregion Sequencing. **The New England Journal of Medicine**, v. 36610, p. 885–892, 2012.
66. GOU, Y. et al. Progress of inertial microfluidics in principle and application. **Sensors (Switzerland)**, v. 18, n. 6, 2018.
67. GRIGORIAN, A.; O'BRIEN, C. B. Hepatotoxicity secondary to chemotherapy. **Journal of Clinical and Translational Hepatology**, v. 2, n. 2, p. 95–102, 2014.
68. GUPTA, N. et al. Microfluidics-based 3D cell culture models: Utility in novel drug discovery and delivery research. **Bioengineering & Translational Medicine**, v. 1,

- n. 1, p. 63–81, 2016.
69. HACKER, G. The morphology of apoptosis. *Cell Tissue Res.* **Cell Tissue Res**, v. 301, p. 5–17, 2000.
  70. HADDOX, J. . et al. Characterization of chemical gradients in the collagen gel-visual chemotactic assay. **Jounal of Immunologocal Methods**, v. 1759, n. 94, p. 1–14, 2010.
  71. HAN, S. J.; KWON, S.; KIM, K. S. Challenges of applying multicellular tumor spheroids in preclinical phase. **Cancer Cell International**, v. 21, n. 1, p. 1–19, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s12935-021-01853-8>>.
  72. HE, B.; CHEN, W.; JANE WANG, Q. Surface texture effect on friction of a microtextured poly(dimethylsiloxane) (PDMS). **Tribology Letters**, v. 31, n. 3, p. 187–197, 2008.
  73. HEO, Y. S. et al. Dynamic Microfunnel Culture Enhances Mouse Embryo Development and Pregnancy Rates. **Human reproduction (Oxford, England)**, v. 25, n. 3, p. 613–622, mar. 2010.
  74. HIREMATH, C. G. et al. Co-delivery of paclitaxel and curcumin to foliate positive cancer cells using Pluronic-coated iron oxide nanoparticles. **Progress in Biomaterials**, v. 8, n. 3, p. 155–168, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s40204-019-0118-5>>.
  75. HO, C. M. B. et al. 3D printed microfluidics for biological applications. **Lab on a Chip**, v. 15, n. 18, p. 3627–3637, 2015.
  76. HONG, T. F. et al. Rapid prototyping of PMMA microfluidic chips utilizing a CO2 laser. **Microfluidics and Nanofluidics**, v. 9, n. 6, p. 1125–1133, 2010.
  77. HOU, Y. et al. Injectable degradable PVA microgels prepared by microfluidic technology for controlled osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. **Acta Biomaterialia**, v. 77, p. 28–37, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.07.003>>.
  78. HU, J. L. et al. CAFs secreted exosomes promote metastasis and chemotherapy resistance by enhancing cell stemness and epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer. **Molecular Cancer**, v. 18, n. 1, p. 1–15, 2019.
  79. HUANG, R. Y. et al. Isobologram analysis: A comprehensive review of

- methodology and current research. **Frontiers in Pharmacology**, v. 10, n. OCT, p. 1–12, 2019.
80. HUH, D. et al. Reconstituting organ-level lung functions on a chip. **Science**, v. 328, n. 5986, p. 1662–1668, 2010.
  81. HUNG, P. J. et al. A novel high aspect ratio microfluidic design to provide a stable and uniform microenvironment for cell growth in a high throughput mammalian cell culture array. **Lab on a chip**, v. 5, n. 1, p. 44–8, jan. 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15616739>>. Acesso em: 10 nov. 2015.
  82. IANEVSKI, A.; GIRI, A. K.; AITTOKALLIO, T. SynergyFinder 2.0: visual analytics of multi-drug combination synergies. **Nucleic acids research**, v. 48, n. W1, p. W488–W493, 2020.
  83. INCA. **Estimativa de Incidência de Câncer no Brasil 2020**. [s.l: s.n.]
  84. INGBER, D. E. Is it Time for Reviewer 3 to Request Human Organ Chip Experiments Instead of Animal Validation Studies? **Advanced Science**, v. 7, n. 22, p. 1–15, 2020.
  85. IRIMIA, D. et al. Microfluidic system for measuring neutrophil migratory responses to fast switches of chemical gradients. **Lab Chip**, v. 6, n. 2, p. 191–198, 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1039/B511877H>>.
  86. ISMAGILOV, R. F. et al. Experimental and theoretical scaling laws for transverse diffusive broadening in two-phase laminar flows in microchannels. **Applied Physics Letters**, v. 76, n. 17, p. 2376–2378, 2000.
  87. JASTRZEBSKA, E.; TOMECKA, E.; JESION, I. Heart-on-a-chip based on stem cell biology. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 75, p. 67–81, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2015.08.012>>.
  88. JOHN, J. . ; SIEBER, O. F. J. Chemotactic Migration of Neutrophils under agarose. **Life Science**, v. 18, n. lx, p. 177–181, 1975.
  89. KAEMMERER, E. et al. Innovative in vitro models for breast cancer drug discovery. **Drug Discovery Today: Disease Models**, v. 21, n. xx, p. 11–16, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ddmod.2017.02.002>>.
  90. KALININ, Y. V et al. Logarithmic sensing in Escherichia coli bacterial chemotaxis. **Biophysical journal**, v. 96, n. 6, p. 2439–48, 18 mar. 2009. Disponível em:

- <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2989150&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 19 ago. 2014.
91. KAPALCZYŃSKA, M. et al. 2D and 3D cell cultures – A comparison of different types of cancer cell cultures. **Archives of Medical Science**, v. 14, n. 4, p. 910–919, 2016.
  92. KASHANINEJAD, N.; SHIDDIKY, M. J. A.; NGUYEN, N. T. Advances in Microfluidics-Based Assisted Reproductive Technology: From Sperm Sorter to Reproductive System-on-a-Chip. **Advanced Biosystems**, v. 2, n. 3, p. 1–21, 2018.
  93. KASHEFI-KHEYRABADI, L. et al. Detachable microfluidic device implemented with electrochemical aptasensor (DeMEA) for sequential analysis of cancerous exosomes. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 169, n. June, p. 112622, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112622>>.
  94. KELM, J. M. et al. Method for generation of homogeneous multicellular tumor spheroids applicable to a wide variety of cell types. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 83, n. 2, p. 173–180, 2003.
  95. KIM, H. et al. Single-neuronal cell culture and monitoring platform using a fully transparent microfluidic DEP device. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–9, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-31576-2>>.
  96. KIMURA, H.; SAKAI, Y.; FUJII, T. Organ/body-on-a-chip based on microfluidic technology for drug discovery. **Drug Metabolism and Pharmacokinetics**, v. 33, n. 1, p. 43–48, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.dmpk.2017.11.003>>.
  97. KLANK, H.; KUTTER, J. P.; GESCHKE, O. CO<sub>2</sub>-laser micromachining and back-end processing for rapid production of PMMA-based microfluidic systems. **Lab on a Chip**, v. 2, n. 4, p. 242–246, 2002.
  98. KOTHAPALLI, C. R. et al. A high-throughput microfluidic assay to study neurite response to growth factor gradients. **Lab on a Chip**, v. 11, n. 3, p. 497–507, 2011.
  99. KOWALIK, A.; KOWALEWSKA, M.; GÓŹDŹ, S. Current approaches for avoiding the limitations of circulating tumor cells detection methods—implications for diagnosis and treatment of patients with solid tumors. **Translational Research**, v. 185, p. 58–84.e15, 2017. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1931524416303498>>.

100. KWAPISZEWSKA, K. et al. A microfluidic-based platform for tumour spheroid culture, monitoring and drug screening. **Lab on a Chip**, v. 14, n. 12, p. 2096–2104, 2014a.
101. KWAPISZEWSKA, K. et al. A microfluidic-based platform for tumour spheroid culture, monitoring and drug screening. **Lab on a Chip**, v. 14, n. 12, p. 2096–2104, 2014b.
102. LACY, C. et al. **Drug Information -Handbook**. 18. ed. Hudson -Ohio: Lexi-Comp -Inc, 2009.
103. LANGHANS, S. A. Three-dimensional in vitro cell culture models in drug discovery and drug repositioning. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, n. JAN, p. 1–14, 2018.
104. LEE, W. G.; KHADEMHOSEINI, A. Microscale electroporation : challenges and perspectives for clinical applications. **Integrate Biology**, v. 1, p. 242–251, 2009.
105. LENGUEL, E. et al. Metformin inhibits ovarian cancer growth and increases sensitivity to paclitaxel in mouse models. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 212, n. 4, p. 479.e1-479.e10, 2015.
106. LI, G. N.; LIU, J.; HOFFMAN-KIM, D. Multi-molecular gradients of permissive and inhibitory cues direct neurite outgrowth. **Annals of Biomedical Engineering**, v. 36, n. 6, p. 889–904, 2008.
107. LI, L. et al. A high-throughput, open-space and reusable microfluidic chip for combinational drug screening on tumor spheroids. **Lab on a Chip**, 2021.
108. LI, M. et al. A review of microfabrication techniques and dielectrophoretic microdevices for particle manipulation and separation. **Journal of Physics D: Applied Physics**, v. 47, n. 6, 2014.
109. LI, X. et al. Tumor vascular-targeted co-delivery of anti-angiogenesis and chemotherapeutic agents by mesoporous silica nanoparticle-based drug delivery system for synergetic therapy of tumor. **International Journal of Nanomedicine**, v. 11, p. 93–105, 2015.
110. LI, Y. et al. High-throughput single cell multidrug resistance analysis with multifunctional gradients-customizing microfluidic device. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 225, p. 563–571, 2016.
111. LI, Y. J. et al. Autophagy and multidrug resistance in cancer. **Chinese journal of**

- cancer**, v. 36, n. 1, p. 52, 2017.
112. LIM, W.; PARK, S. A microfluidic spheroid culture device with a concentration gradient generator for high-throughput screening of drug efficacy. **Molecules**, v. 23, n. 12, 2018.
  113. LIMERES, M. J. et al. Thinking small, doing big: Current success and future trends in drug delivery systems for improving cancer therapy with special focus on liver cancer. **Materials Science and Engineering C**, v. 95, n. September 2018, p. 328–341, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.11.001>>.
  114. LIN, S. et al. Efficiency against multidrug resistance by co-delivery of doxorubicin and curcumin with a legumain-sensitive nanocarrier. **Nano Research**, v. 11, n. 7, p. 3619–3635, 2018a.
  115. LIN, X. et al. Oxygen-induced cell migration and on-line monitoring biomarkers modulation of cervical cancers on a microfluidic system. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, p. 9643, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/srep09643>>.
  116. LIN, Y. et al. Soft lithography based on photolithography and two-photon polymerization. **Microfluidics and Nanofluidics**, v. 22, n. 9, p. 0, 2018b. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s10404-018-2118-5>>.
  117. LIN, Y. H.; PAN, T. M.; WU, M. H. Microfluidic Technology and Its Biological Applications. **Comprehensive Biotechnology, Second Edition**, v. 5, p. 141–157, 2011.
  118. LIU, H. et al. Heart-on-a-Chip Model with Integrated Extra- And Intracellular Bioelectronics for Monitoring Cardiac Electrophysiology under Acute Hypoxia. **Nano Letters**, v. 20, n. 4, p. 2585–2593, 2020a.
  119. LIU, R.; LI, X.; LAM, K. S. Combinatorial chemistry in drug discovery. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 38, p. 117–126, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2017.03.017>>.
  120. LIU, X. Y. et al. SYTL4 downregulates microtubule stability and confers paclitaxel resistance in triple-negative breast cancer. **Theranostics**, v. 10, n. 24, p. 10940–10956, 2020b.
  121. LOW, L. A. et al. Organs-on-chips: into the next decade. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 20, n. 5, p. 345–361, 2021. Disponível em:

- <<http://dx.doi.org/10.1038/s41573-020-0079-3>>.
122. LUTZ, B. R.; CHEN, J.; SCHWARTZ, D. T. Microfluidics without microfabrication. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 8, p. 4395–8, 15 abr. 2003. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=153565&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.
  123. LV, S. et al. Co-delivery of doxorubicin and paclitaxel by PEG-polypeptide nanovehicle for the treatment of non-small cell lung cancer. **Biomaterials**, v. 35, n. 23, p. 6118–6129, 2014.
  124. MAEKI, M. et al. Advances in microfluidics for lipid nanoparticles and extracellular vesicles and applications in drug delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 128, p. 84–100, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.03.008>>.
  125. MARTÍNEZ-LÓPEZ, J. I. et al. Rapid fabrication of disposable micromixing arrays using xurography and laser ablation. **Micromachines**, v. 8, n. 5, 2017.
  126. MATA, A.; FLEISCHMAN, A. J.; ROY, S. Characterization of Polydimethylsiloxane (PDMS) Properties for Biomedical Micro/Nanosystems. **Biomedical Microdevices**, v. 7, n. 4, p. 281–293, 2005.
  127. MAURO, L. et al. Evidence that leptin up-regulates E-cadherin expression in breast cancer: Effects on tumor growth and progression. **Cancer Research**, v. 67, n. 7, p. 3412–3421, 2007.
  128. MAZZIO, E. et al. Whole-transcriptome analysis of fully viable energy efficient glycolytic-null cancer cells established by double genetic knockout of lactate dehydrogenase A/B or glucose-6-phosphate isomerase. **Cancer Genomics and Proteomics**, v. 17, n. 5, p. 469–497, 2020.
  129. MI, S. et al. Microfluidic co-culture system for cancer migratory analysis and anti-metastatic drugs screening. **Nature Publishing Group**, n. October, p. 1–11, 2016.
  130. MIZUTANI, F. et al. Rapid and accurate determination of NADH by an amperometric sensor with a bilayer membrane consisting of a polyion complex layer and an NADH oxidase layer. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 65, n. 1, p. 46–48, 2000.

131. MO, S. J. et al. A microfluidic gradient device for drug screening with human iPSC-derived motoneurons. **Analyst**, v. 145, n. 8, p. 3081–3089, 2020.
132. MULHOLLAND, T. et al. Drug screening of biopsy-derived spheroids using a self-generated microfluidic concentration gradient. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–12, 2018.
133. MÜLLER, E. et al. Distinguishing autocrine and paracrine signals in hematopoietic stem cell culture using a biofunctional microcavity platform. **Scientific Reports**, v. 6, n. March, p. 1–12, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/srep31951>>.
134. NAKASONE, E. S. et al. Imaging Tumor-Stroma Interactions during Chemotherapy Reveals Contributions of the Microenvironment to Resistance. **Cancer Cell**, v. 21, n. 4, p. 488–503, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2012.02.017>>.
135. NAN, L.; JIANG, Z.; WEI, X. Emerging microfluidic devices for cell lysis: A review. **Lab on a Chip**, v. 14, n. 6, p. 1060–1073, 2014.
136. NANDAGOPAL, S.; WU, D.; LIN, F. Combinatorial guidance by CCR7 ligands for T lymphocytes migration in co-existing chemokine fields. **PLoS ONE**, v. 6, n. 3, 2011.
137. NAOMI HANDLY, L.; PILKO, A.; WOLLMAN, R. Paracrine communication maximizes cellular response fidelity in wound signaling. **eLife**, v. 4, n. OCTOBER2015, p. 1–18, 2015.
138. NATIONAL CANCER INSTITUTION. **What Is Cancer?** Disponível em: <<https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>>.
139. NENDZA, M. Hazard assessment of silicone oils (polydimethylsiloxanes, PDMS) used in antifouling-/foul-release-products in the marine environment. **Marine Pollution Bulletin**, v. 54, n. 8, p. 1190–1196, 2007.
140. NEUVILLE, A. et al. Xurography for microfluidics on a reactive solid. **Lab on a Chip**, v. 17, n. 2, p. 293–303, 2017.
141. NGUYEN, A. V. et al. Diffusion-Convection Hybrid Microfluidic Platform for Rapid Antibiotic Susceptibility Testing. **Analytical Chemistry**, v. 93, n. 14, p. 5789–5796, 2021.
142. NOOTER, K.; HERWEIJER, H. Multidrug resistance in human cancer. **British**

- Journal of Cancer**, v. 63, n. 3, p. 663–669, 1991.
143. NUNES, A. S. et al. Establishment of 2D Cell Cultures Derived From 3D MCF-7 Spheroids Displaying a Doxorubicin Resistant Profile. **Biotechnology Journal**, v. 14, n. 4, p. 1–16, 2019.
  144. OLIVEIRA, a. F. et al. Cultivation of yeast in diffusion-based microfluidic device. **Biochemical Engineering Journal**, v. 105, p. 288–295, jan. 2016a. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369703X15300607>>. Acesso em: 10 nov. 2015.
  145. OLIVEIRA, A. F. et al. Microfluidic tools toward industrial biotechnology. **Biotechnology Progress**, v. 32, n. 6, p. 1372–1389, 2016b.
  146. OMRAN, Z. et al. Pinocytosis as the Biological Mechanism That Protects Pgp Function in Multidrug Resistant Cancer. **Symmetry**, 2020.
  147. PAGE, H.; FLOOD, P.; REYNAUD, E. G. Three-Dimensional Tissue Cultures: Current Trends and Beyond. **Cell and tissue research**, v. 352, n. 1, p. 123–131, abr. 2013.
  148. PARIS, J.; ANGELI, E.; BOUSQUET, G. The pharmacology of xenobiotics after intracerebro spinal fluid administration: Implications for the treatment of brain tumors. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 3, p. 1–14, 2021.
  149. PARK, J. Y. et al. Gradient Generation by an Osmotic Pump and the Behavior of Human Mesenchymal Stem Cells under the Fetal Bovine Serum Concentration Gradient. **Lab on a chip**, v. 7, n. 12, p. 1673–1680, dez. 2007.
  150. PARK, J. Y. et al. Simultaneous generation of chemical concentration and mechanical shear stress gradients using microfluidic osmotic flow comparable to interstitial flow. **Lab on a chip**, v. 9, n. 15, p. 2194–202, 7 ago. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19606296>>. Acesso em: 11 out. 2015.
  151. PATRA, B. et al. A microfluidic device for uniform-sized cell spheroids formation, culture, harvesting and flow cytometry analysis. **Biomicrofluidics**, v. 7, n. 5, p. 54114, 1 set. 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1063/1.4824480>>.
  152. PATRA, B. et al. Drug testing and flow cytometry analysis on a large number of uniform sized tumor spheroids using a microfluidic device. **Scientific Reports**, v. 6, n. January, p. 1–12, 2016.

153. PELIZZARI, G. et al. Lactate Dehydrogenase (LDH) response to first-line treatment predicts survival in metastatic breast cancer: First clues for a cost-effective and dynamic biomarker. **Cancers**, v. 11, n. 9, p. 1–13, 2019.
154. PERRODIN, P.; SELLA, C.; THOUIN, L. Electrochemical Generation of Steady-State Linear Concentration Gradients within Microfluidic Channels Perpendicular to the Flow Field. **Analytical Chemistry**, v. 92, n. 11, p. 7699–7707, 2020.
155. PHARMACEUTICAL INDUSTRY PROFILE. **Pharmaceutical Research and Manufacturers of AmericaPhRMA**. [s.l: s.n.].
156. PITINGOLO, G. et al. Tunable and Reversible Gelatin-Based Bonding for Microfluidic Cell Culture. **Advanced Engineering Materials**, v. 21, n. 8, p. 1–10, 2019.
157. POLJAKOVÁ, J. et al. The comparison of cytotoxicity of the anticancer drugs doxorubicin and ellipticine to human neuroblastoma cells. **Interdisciplinary Toxicology**, v. 1, n. 2, p. 186–189, 2008.
158. QI, S. et al. Co-delivery nanoparticles of anti-cancer drugs for improving chemotherapy efficacy. **Drug Delivery**, v. 14, n. 0, p. 1909–1926, 2017.
159. REBUCCI, M.; MICHIELS, C. Molecular aspects of cancer cell resistance to chemotherapy. **Biochemical Pharmacology**, v. 85, n. 9, p. 1219–1226, 2013. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006295213001214>>.
160. RIEGER, A. M. et al. Modified Annexin V / Propidium Iodide Apoptosis Assay For Accurate Assessment of Cell Death. n. April, p. 3–6, 2011.
161. RISMANIAN, M.; SAIDI, M. S.; KASHANINEJAD, N. A microfluidic concentration gradient generator for simultaneous delivery of two reagents on a millimeter-sized sample. **Journal of Flow Chemistry**, v. 10, n. 4, p. 615–625, 2020.
162. RODRÍGUEZ-CABALLERO, A. et al. Cancer treatment-induced oral mucositis: A critical review. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 41, n. 2, p. 225–238, 2012.
163. ROGERS, J. A.; NUZZO, R. G. Recent progress in soft lithography. **Materials Today**, v. 8, n. 2, p. 50–56, 2005. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S1369-7021\(05\)00702-9](http://dx.doi.org/10.1016/S1369-7021(05)00702-9)>.

164. ROSEN, J. M.; ROARTY, K. Paracrine signaling in mammary gland development: What can we learn about intratumoral heterogeneity? **Breast Cancer Research**, v. 16, n. 1, p. 1–6, 2014.
165. RYU, N. E.; LEE, S. H.; PARK, H. Spheroid Culture System Methods and Applications for Mesenchymal Stem Cells. **Cells**, v. 8, n. 12, p. 1–13, 2019.
166. SAMPER, I. C. et al. 3D printed microfluidic device for online detection of neurochemical changes with high temporal resolution in human brain microdialysate. **Lab on a Chip**, v. 19, n. 11, p. 2038–2048, 2019.
167. SATO, Y.; TAKINOUE, M. Creation of artificial cell-like structures promoted by microfluidics technologies. **Micromachines**, v. 10, n. 4, 2019.
168. SCHIFFMANN, E. Leukocyte chemotaxis. **Annual Review of Physiology**, v. 42, n. 11, p. 2851–2862, 1983.
169. SCHUSTER, B. et al. Automated microfluidic platform for dynamic and combinatorial drug screening of tumor organoids. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 1–12, 2020.
170. SENAPATI, S. et al. Controlled drug delivery vehicles for cancer treatment and their performance. **Drug Delivery Vehicles for Cancer Treatment**, n. November 2017, p. 1–19, 2018.
171. SHAKERI, A. et al. Biofunctional interfaces for cell culture in microfluidic devices. In: **Bioelectronics and Medical Devices**. [s.l.] Elsevier Ltd, 2019. p. 635–700.
172. SHEN, S. et al. Three-gradient constructions in a flow-rate insensitive microfluidic system for drug screening towards personalized treatment. **Talanta**, n. October, p. 120477, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.120477>>.
173. SHI, Y. et al. Recent advances in microfluidic technology and applications for anti-cancer drug screening Yiwei. **Journal of the Neurological Sciences**, p. 116544, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jns.2019.116544>>.
174. SHIELDS, C. W.; REYES, D.; LÓPEZ, G. P. Lab on a Chip in the separation of cells from debulking to rare. **Lab on a Chip**, v. 15, p. 1230–1249, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1039/C4LC01246A>>.
175. SHIROMA, L. S. et al. Self-regenerating and hybrid irreversible / reversible PDMS microfluidic devices. **Nature Publishing Group**, n. April, p. 1–12, 2016. Disponível

- em: <<http://dx.doi.org/10.1038/srep26032>>.
176. SHRI, M. et al. Hanging drop, a best three-dimensional (3D) culture method for primary buffalo and sheep hepatocytes. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–13, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-01355-6>>.
  177. SI, L. et al. A human-airway-on-a-chip for the rapid identification of candidate antiviral therapeutics and prophylactics. **Nature Biomedical Engineering**, v. 5, n. 8, p. 815–829, 2021. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41551-021-00718-9>>.
  178. SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2020. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 70, n. 1, p. 7–30, 2020.
  179. SNAKENBORG, D.; KLANK, H.; KUTTER, J. P. Microstructure fabrication with a {CO}2 laser system. **Journal of Micromechanics and Microengineering**, v. 14, n. 2, p. 182–189, 2003. Disponível em: <<https://doi.org/10.1088%2F0960-1317%2F14%2F2%2F003>>.
  180. SOARES, M. C. P. et al. Perfusion microfermentor integrated into a fiber optic quasi-elastic light scattering sensor for fast screening of microbial growth parameters. **Sensors (Switzerland)**, v. 19, n. 11, 2019.
  181. SOMAWEERA, H.; IBRAGUIMOV, A.; PAPPAS, D. A review of chemical gradient systems for cell analysis. **Analytica Chimica Acta**, v. 907, p. 7–17, 2016. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003267015300398>>.
  182. SONG, J. W.; MUNN, L. L. Fluid forces control endothelial sprouting. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 37, p. 15342–15347, 2011. Disponível em: <<https://www.pnas.org/content/108/37/15342>>.
  183. SONG, K. Y. et al. Enhancement of the surface free energy of PDMS for reversible and leakage-free bonding of PDMS–PS microfluidic cell-culture systems. **Microfluidics and Nanofluidics**, v. 22, n. 11, p. 0, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s10404-018-2152-3>>.
  184. STOUT, N. L. et al. A Systematic Review of Exercise Systematic Reviews in the Cancer Literature (2005–2017). **PM and R**, v. 9, n. 9, p. S347–S384, 2017.
  185. SU, R. et al. 3D printed self-supporting elastomeric structures for multifunctional microfluidics. **Science Advances**, v. 6, n. 41, p. 1–11, 2020.

186. SUN, J. et al. An on-chip cell culturing and combinatorial drug screening system. **Microfluidics and Nanofluidics**, v. 21, n. 7, p. 1–11, 2017a.
187. SUN, J.; WARDEN, A. R.; DING, X. Recent advances in microfluidics for drug screening. **Biomicrofluidics**, v. 13, n. 6, 2019.
188. SUN, Y. S. et al. Risk factors and preventions of breast cancer. **International Journal of Biological Sciences**, v. 13, n. 11, p. 1387–1397, 2017b.
189. SZETO, G. L. et al. Microfluidic squeezing for intracellular antigen loading in polyclonal B-cells as cellular vaccines. **Scientific Reports**, v. 5, n. April, p. 1–13, 2015.
190. TAGER, A. M. et al. BLTR mediates leukotriene B4-induced chemotaxis and adhesion and plays a dominant role in eosinophil accumulation in a murine model of peritonitis. **Journal of Experimental Medicine**, v. 192, n. 3, p. 439–446, 2000.
191. TANG, M. et al. A linear concentration gradient generator based on multi-layered centrifugal microfluidics and its application in antimicrobial susceptibility testing. **Lab on a Chip**, v. 18, n. 10, p. 1452–1460, 2018.
192. TANG, Q. et al. Fabrication of a hydroxyapatite-PDMS microfluidic chip for bone-related cell culture and drug screening. **Bioactive Materials**, v. 6, n. 1, p. 169–178, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2020.07.016>>.
193. TANYERI, M.; TAY, S. Viable cell culture in PDMS-based microfluidic devices. **Methods in Cell Biology**, v. 148, p. 3–33, 2018.
194. THANGAWNG, A. L. et al. An ultra-thin PDMS membrane as a bio / micro – nano interface : fabrication and characterization. **Biomedical microdevices**, p. 587–595, 2007.
195. TRAN, S. et al. Cancer nanomedicine : a review of recent success in drug delivery. **Clinical and Translational Medicine**, v. 6, p. 1–21, 2017.
196. TSAI, Y. A. et al. Ultra-Thin Porous PDLLA Films Promote Generation, Maintenance, and Viability of Stem Cell Spheroids. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 9, n. June, p. 1–12, 2021.
197. UDOMRAT, S. et al. Poly-L-lysine modified ITO surface for enhanced cell growth. **Materials Today: Proceedings**, v. 5, n. 5, p. 11083–11088, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.matpr.2018.01.025>>.

198. UHL, C. G.; MUZYKANTOV, V. R.; LIU, Y. Biomimetic microfluidic platform for the quantification of transient endothelial monolayer permeability and therapeutic transport under mimicked cancerous conditions. **Biomicrofluidics**, v. 12, n. 1, 2018.
199. VAN DUINEN, V. et al. Microfluidic 3D cell culture: From tools to tissue models. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 35, p. 118–126, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2015.05.002>>.
200. VISAGIE, M. H.; BIRKHOLTZ, L. M.; JOUBERT, A. M. 17-Beta-Estradiol Analog Inhibits Cell Proliferation By Induction of Apoptosis in Breast Cell Lines. **Microscopy Research and Technique**, v. 77, n. 3, p. 236–242, 2014.
201. VIT, F. F. et al. Perfusion microbioreactor system with permeable membranes to monitor bacterial growth. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 94, n. 3, p. 712–720, 2018.
202. VIT, F. F. et al. A modular , reversible sealing , and reusable microfluidic device for drug screening. **Analytica Chimica Acta**, v. 1185, p. 1–13, 2021b.
203. WAKS, A. G.; WINER, E. P. Breast Cancer Treatment: A Review. **JAMA - Journal of the American Medical Association**, v. 321, n. 3, p. 288–300, 2019.
204. WANG, C.; TONG, X.; YANG, F. Bioengineered 3D brain tumor model to elucidate the effects of matrix stiffness on glioblastoma cell behavior using peg-based hydrogels. **Molecular Pharmaceutics**, v. 11, n. 7, p. 2115–2125, 2014.
205. WANG, H. et al. Comparison of photodynamic treatment produced cell damage between human breast cancer cell MCF-7 and its multidrug resistance cell. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 16, p. 1–8, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.pdpdt.2016.07.004>>.
206. WANG, S. J. et al. Differential effects of EGF gradient profiles on MDA-MB-231 breast cancer cell chemotaxis. **Experimental Cell Research**, v. 300, n. 1, p. 180–189, 2004.
207. WANG, S.; TIAN, Q.; AN, F. Growth inhibition and apoptotic effects of total flavonoids from *trolius chinensis* on human breast cancer MCF-7 cells. **Oncology Letters**, v. 12, n. 3, p. 1705–1710, 2016.
208. WANG, X.; LIU, Z.; PANG, Y. Concentration gradient generation methods based on microfluidic systems. **RSC Advances**, v. 7, n. 48, p. 29966–29984, 2017.

209. WELTY, J. R. et al. **Fundamentals of Momentum, Heat and Mass Transfer**. 4. ed. New York: John Wiley & Sons, 2001.
210. WENG, L. IVF-on-a-Chip: Recent Advances in Microfluidics Technology for In Vitro Fertilization. **SLAS Technology**, v. 24, n. 4, p. 373–385, 2019.
211. WHITESIDES, G. M. The origins and the future of microfluidics. **Nature**, v. 442, n. 7101, p. 368–73, 27 jul. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16871203>>. Acesso em: 10 jul. 2014.
212. WONG, A. H. et al. Drug screening of cancer cell lines and human primary tumors using droplet microfluidics. p. 1–15, 2017.
213. WOOTTON, R. C. R.; DEMELLO, A. J. Analog-to-digital Primed for resistance. **Nature**, v. 483, n. 7387, p. 43–44, 2012.
214. WU, B. et al. Codelivery of doxorubicin and triptolide with reduction-sensitive lipid–polymer hybrid nanoparticles for *in vitro* and *in vivo* synergistic cancer treatment. **International Journal of Nanomedicine**, v. 12, p. 1853–1862, 2017.
215. WU, G. et al. Overview of Recent Strategic Advances in Medicinal Chemistry. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 62, n. 21, p. 9375–9414, 2019.
216. WU, Q. et al. Organ-on-a-chip: Recent breakthroughs and future prospects. **BioMedical Engineering Online**, v. 19, n. 1, p. 1–19, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s12938-020-0752-0>>.
217. XU, Z. et al. Application of a microfluidic chip-based 3D co-culture to test drug sensitivity for individualized treatment of lung cancer. **Biomaterials**, v. 34, n. 16, p. 4109–4117, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.02.045>>.
218. YAN, J. et al. Fabrication of a pH/Redox-Triggered Mesoporous Silica-Based Nanoparticle with Microfluidics for Anticancer Drugs Doxorubicin and Paclitaxel Codelivery. **ACS Applied Bio Materials**, v. 3, n. 2, p. 1216–1225, 2020.
219. YANG, W. et al. Mask-free generation of multicellular 3D heterospheroids array for high-throughput combinatorial anti-cancer drug screening. **Materials and Design**, v. 183, p. 108182, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.matdes.2019.108182>>.
220. YAO, Y. F. et al. (–)-Epigallocatechin-3-gallate alleviates doxorubicin-induced

- cardiotoxicity in sarcoma 180 tumor-bearing mice. **Life Sciences**, v. 180, p. 151–159, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2016.12.004>>.
221. YU, Y. et al. Ultra-Short Pulsed Laser Manufacturing and Surface Processing of Microdevices. **Engineering**, v. 4, n. 6, p. 779–786, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.eng.2018.10.004>>.
  222. ZHAI, J. et al. Cell-based drug screening on microfluidics. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 117, p. 231–241, 2019.
  223. ZHANG, B. et al. Advances in organ-on-a-chip engineering. **Nature Reviews Materials**, v. 3, n. 8, p. 257–278, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41578-018-0034-7>>.
  224. ZHANG, B.; RADISIC, M. Organ-on-a-Chip devices advance to market. **Lab on a chip**, v. 17, p. 2395–2420, 2017.
  225. ZHANG, H. et al. Chemical molecular-based approach to overcome multidrug resistance in cancer by targeting P-glycoprotein (P-gp). **Medicinal Research Reviews**, v. 41, n. 1, p. 525–555, 2021.
  226. ZHANG, Z. et al. Microfluidics 3D gel-island chip for single cell isolation and lineage-dependent drug responses study. **Lab on a Chip**, v. 16, n. 13, p. 2504–2512, 2016.
  227. ZHAO, C.; GE, Z.; YANG, C. Microfluidic techniques for analytes concentration. **Micromachines**, v. 8, n. 1, p. 1–32, 2017.
  228. ZHENG, H. et al. Rotary culture promotes the proliferation of MCF-7 cells encapsulated in three-dimensional collagen-alginate hydrogels via activation of the ERK1/2-MAPK pathway. **Biomedical Materials**, v. 7, n. 1, 2012.
  229. ZHENG, Y.; SHAO, Y.; FU, J. A microfluidics-based stem cell model of early post-implantation human development. **Nature Protocols**, v. 16, n. 1, p. 309–326, 2021. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41596-020-00417-w>>.
  230. ZHU, D. et al. Folate-targeted polymersomes loaded with both paclitaxel and doxorubicin for the combination chemotherapy of hepatocellular carcinoma. **Acta Biomaterialia**, v. 58, p. 399–412, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2017.06.017>>.

---

## Anexo I-Protocolos

---

### **Protocolo congelamento de células MCF-7**

Para congelar células é recomendável congelar cerca de  $1 \times 10^6$  células por mL.

- 1- Tripsinizar as células nas garrafas (tripsina EDTA 0,25%-O volume de tripsina vai depender do tamanho da garrafa de cultivo celular: média 72 cm<sup>2</sup>: 3 mL e pequena 37cm<sup>2</sup>: 1 mL)
- 2- Incubar por 30 segundos a 1 mim (verificar dados de tripsinização para cada tipo de célula -Ver ATCC)
- 3- Neutralizar com meio completo (contendo soro fetal bovino e antibiótico) com a mesma quantidade utilizada de tripsina
- 4- Após a tripsinização, centrifugar por 5 min a 1500 RPM
- 5- Retirar o sobrenadante cuidadosamente
- 6- Ressuspender as células com 1 mL de meio completo
- 7- Retirar uma alíquota (20 µL) de células
- 8- Diluir as células em 20 µL de azul de tripan
- 9- Contar o número de células em câmara de Neubauer
- 10- Após a contagem, verificar a alíquota necessária, que contenha  $1 \times 10^6$  células para completar o volume com meio a fim que tenha 650 µL de células e meio.
- 11- Colocar em batoques de 1 mL juntamente com 20% de soro fetal bovino (200 µL) e 10 % de DMSO (100 µL) (volume total deve ser 950 µL para cada tubinho de congelamento-batoque)
- 12- Colocar as amostras em biofreezer (-80 °C) por 24 h
- 13- Após congelar em nitrogênio.

### **Protocolo marcação células 2D**

1. Primeiramente foi retirado o meio de cultivo presente nos poços, e adicionado e realizado uma lavagem com PBS 1X (3 lavagens de 5 minutos)
2. Após o foi adicionado a amostras paraformaldeído 4% por 30 minutos.

3. Foi novamente realizado 3 lavagens de 5 minutos cada com PBS 1X
4. Após o processo de lavagem, foi adicionado os marcadores diluídos em uma solução contendo 4 mL de DPBS 0,05%, sendo 4uL do marcador faloídina e 2 uL do marcador DAPI), deixando a solução agir sobre a amostra durante 1 h.
5. Após a marcação das células, foi retirada solução e feita a última etapa de lavagem contendo PBS 1X (3 lavagens de 10 minutos cada).
6. Foi adicionado de meio de montagem, para preservar as amostras. As amostras foram guardadas sob refrigeração a 4° C e ao abrigo da luz.

### **Protocolo marcação esferoides**

1. Primeiramente foi retirado o meio de cultivo presente nos poços, e adicionado 150 µL do fixador durante 20 minutos.
2. Após o fixador foi removido cuidadosamente para não retirar os esferoides e foi realizada 3 lavagens de 5 minutos com PBS 1X
3. Foi adicionado 150 uL de PBS 1X contendo 0,5% de Triton 10 por 10 minutos.
4. A amostra foi novamente lavada 3 vezes com PBS 1X por 5 minutos (cada lavagem).
5. Para que os marcadores se liguem apenas nos esferoides, foi adicionada uma solução de bloqueio, contendo 150 µL de PBS 1X 0,8% de BSA e 0,8% de triton X100. A solução foi adicionada em cada um dos poços durante 1h.
6. Foi novamente realizada a etapa de lavagem com PBS 1X% e twin 20 (3 lavagens de 5 minutos cada)
7. Após o processo de lavagem, foi adicionado os marcadores diluídos em uma solução contendo 1 mL de DPBS 1X 40 mg de BSA, e os marcadores (2µL de faloídina e 1 µL do marcador DAPI-). Foi adicionado em cada um dos poços 150 µL da solução por 1 h.
8. Após a marcação das células, foi retirada solução e feita a última etapa de lavagem contendo PBS 1X (3 lavagens de 10 minutos cada).

9. Foi adicionado 1  $\mu$ L de meio de montagem, para preservar as amostras. As amostras foram guardadas sob refrigeração a 4°C e ao abrigo da luz.

### **Meio de montagem**

Para 10 mL de meio de montagem:

-Glicerol 90%: 9 mL

-Tris HCl- 1 Ml em pH 8.0

-N-Propil galato 0,5%:50 mg

Aquecer a solução a 37°C, misturar em vórtex por 30 min. Armazenar a 4°C ao abrigo da luz.

### **Fixador**

Para aproximadamente 3,7 mL

-Paraformaldeído 4%: 3,5 mL

-Sacarose 5 %: 175 mg

-Triton X100:0,6 %: 21  $\mu$ L

O fixado deve ser aquecido a 37 °C antes de ser utilizado.

### **Secagem química e fixação para MEV**

1-Centrifugar a amostra

2-Retirar o sobrenadante

3-Resuspender com paraformaldeído 4% (300 $\mu$ L) e glutaraldeído 2% (300  $\mu$ L)

4-Deixar a amostra na refrigerada (4°C), overnight.

5-Lavar a amostra com água MILIQ 2X durante 10 min cada lavagem

6-Desidratar as amostras em séries graduadas de solução de etanol (30,50,70,95 e 100 %-300  $\mu$ L cada)

7-Repetir cada série 2 x, pode 10 min cada série.

- 8- Secar as amostras utilizando na proporção 1:1, etanol 100% e hexametildisilano (HDMS), durante 20 min (300 µL-cada)
- 9 Repetir a secagem novamente utilizando apenas HDMS (100 %-300) (por mais 20 min -300 µL).
- 10- Deixar as amostras secando overnight

#### **Centrifugação dos esferoides para colocar no microdispositivo**

- 1- Quebrar a matriz com Dispase II (200 µL por 1 h a 37°C)
- 2- Retirar os esferoides com a DispaseII e adicionar uma solução contendo DPS 1% e Soro fetal bovino 1% (1200 µL da solução)
- 3- Centrifugar por 5 min a 1500 RPM
- 4- Retirar o sobrenadante e adicionar uma proporção de :1 de meio de cultivo (contendo os esferoides) e Matrigel® (67 µL de meio com os esferoides +33 µL de Matrigel®)
- 5- Adiciona 4 µL da solução em cada poço;
- 6- Levar a incubadora 37°C por 1 h para polimerizar a matriz
- 7- Preencher com meio

#### **Ensaio de MTT (Citotoxicidade)**

Tempo de análise: 72 h

Etapa 1:

- 1- Colocar 10.000 células em placas de 96 poços e preencher de meio (~100 µL)
- 2- Incubar por 24 h a 37 ° C para aderir
- 3- Retirar o meio e fazer duas lavagens de 5 min com PBS1 X
- 4- Adicionar o material que gostaria de testar em diferentes concentrações, diluído em meio sem soro fetal bovino e antibiótico
- 5- Incubar por 24 h

Etapa 2

6- Retirar o meio contendo o material que permaneceu em contato com as células por 24 h

6- Realizar mais duas lavagens com PBS 1X 5 min cada lavagem

7- Preencher o poço referente a 24 h com meio completo (contendo soro e antibiótico)

8- Incubar por mais 24 h

9- Repetir o mesmo procedimento para os tempos de 48 h e 72 h

OBS: Os poços contendo as células controle (sem nenhum material/ reagente, o meio deve ser trocado a cada 24 h)

### Etapa 3

10- Após o último tempo (72 h), retirar o meio de todos os poços, fazer uma lavar com PBS 1 X por 5 min.

11- Retirar o PBS e adicionar o reagente MTT

12- Incubar as células com o reagente MTT por 3 h a 37 °C

13- Após adicionar aos poços uma solução contendo DMSO 0,25 % diluído em PBX 1X

14- Fazer a leitura das placas em leitor de placas a 540nm

15- Anotar os resultados

### Preparo do reagente MTT

-Diluir 0,5mg do reagente de MTT em 1 mL de meio sem soro e antibiótico

OBS2: É recomendado fazer as análises de cada reagente ou material em triplicatas. O cálculo de células viáveis é realizado para o valor encontrado em cada poço, de acordo com a Equação 1 abaixo:

*% de células viáveis*

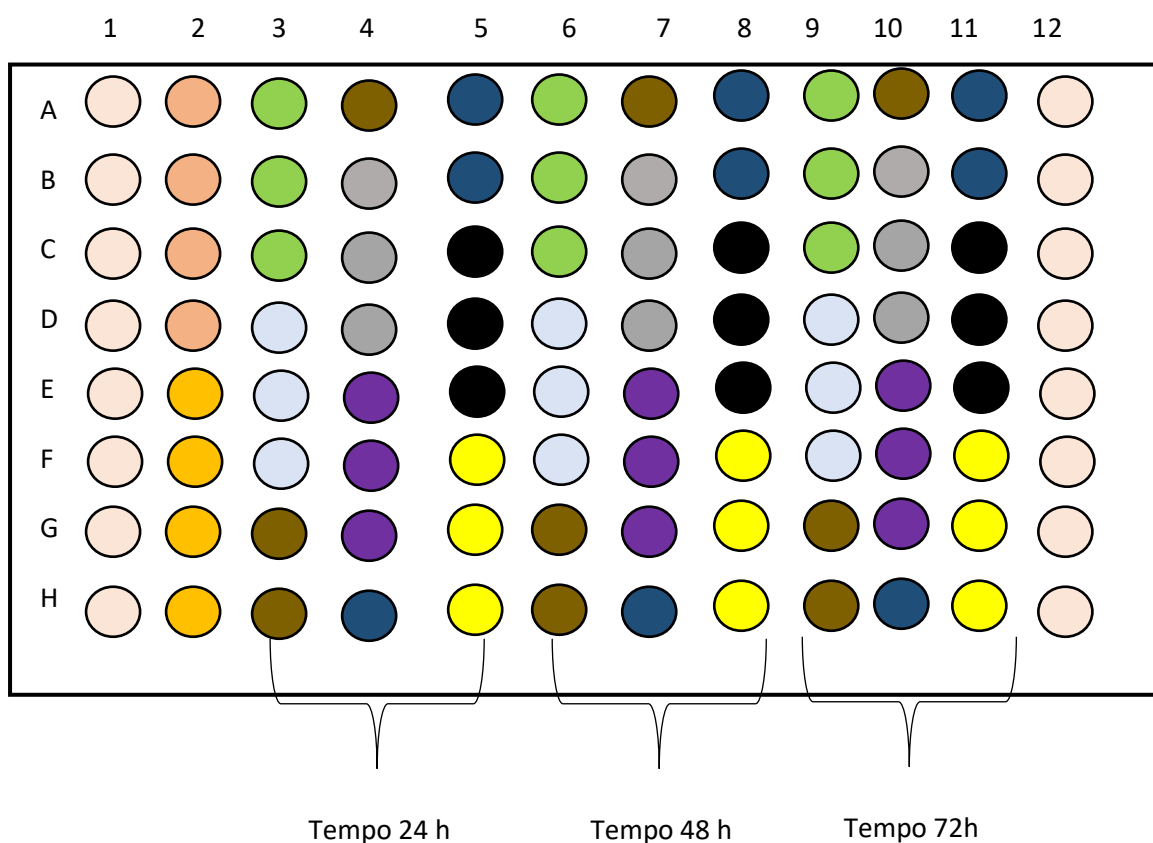
$$= \frac{(\text{absorbância da amostra} - \text{absorbância do branco})}{(\text{absorbância do controle negativo} - \text{absorbância do branco})} \times 100$$

CN: Controle negativo: apenas células

B: Branco Meio de cultivo sem soro fetal, antibiótico e células

CP: Controle positivo: células com o solvente

CS: Controle do solvente (DMSO 0,25 %)



Coluna 1: Meio sem soro fetal e antibiótico (B)

Coluna 2: CN e CP

Coluna 3- 5: Referente ao tempo de 24 h, cada cor representa uma concentração diferente do material testado

Coluna 6- 8: Referente ao tempo de 48 h, cada cor representa uma concentração diferente do material testado

Coluna 9- 11: Referente ao tempo de 72 h, cada cor representa uma concentração diferente do material testado

Coluna 12: Meio sem soro fetal e antibiótico (B)

## Anexo II- Material Suplementar Capítulo 4

### Contagem automática de células viáveis (MATLAB).

O número de células foi normalizado dividindo o número inicial de células pelo o número de células em cada tempo (t).

**Tabela 1:** Contagem manual e automática (MATLAB) das células viáveis sem o tratamento com DOX (Controle)

| Controle<br>(regiões) | Manual count<br>(N/N <sub>0</sub> ) |        |         |        |        |
|-----------------------|-------------------------------------|--------|---------|--------|--------|
|                       | tempo<br>(min)                      |        |         |        |        |
|                       | 0                                   | 30     | 60      | 120    | 180    |
| A                     | 1                                   | 1.1178 | 1.1860  | 1.2141 | 1.2354 |
| B                     | 1                                   | 1.0659 | 1.1047  | 1.1238 | 1.1753 |
| C                     | 1                                   | 1.1420 | 1.1570  | 1.1606 | 1.1888 |
| D                     | 1                                   | 1.1132 | 1.1493  | 1.1624 | 1.1897 |
| E                     | 1                                   | 1.1155 | 1.1856  | 1.2121 | 1.2530 |
| F                     | 1                                   | 1.1536 | 1.2047  | 1.2535 | 1.2872 |
| Controle<br>(regiões) | MATLAB<br>(N/N <sub>0</sub> )       |        |         |        |        |
|                       | Tempo<br>(min)                      |        |         |        |        |
|                       | 0                                   | 30     | 60      | 120    | 180    |
| A                     | 1                                   | 1.0127 | 1.1338  | 1.1547 | 1.1828 |
| B                     | 1                                   | 1.0333 | 1.0589  | 1.1300 | 1.1500 |
| C                     | 1                                   | 1.0280 | 1.0748  | 1.0915 | 1.1133 |
| D                     | 1                                   | 1.1376 | 1.16493 | 1.1918 | 1.1999 |
| E                     | 1                                   | 1.1333 | 1.16133 | 1.1867 | 1.2167 |
| F                     | 1                                   | 1.1250 | 1.1896  | 1.2130 | 1.2513 |

**Tabela 2:** Contagem manual e automática (MATLAB) do número de células viáveis nas diferentes concentrações de DOX

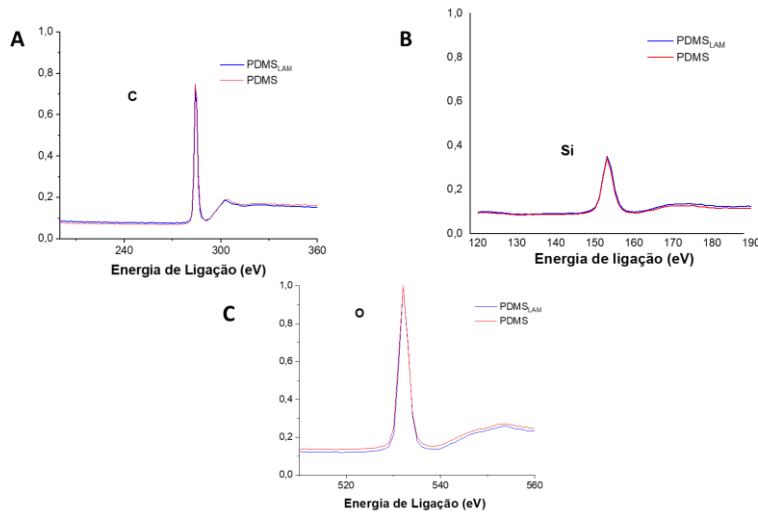
| DOX<br>concentração<br>(mg. mL <sup>-1</sup> ) | Manual<br>(N/N <sub>0</sub> ) |         |         |         |         |
|------------------------------------------------|-------------------------------|---------|---------|---------|---------|
|                                                | Tempo<br>(min)                |         |         |         |         |
|                                                | 0                             | 30      | 60      | 120     | 180     |
| 0.011                                          | 1                             | 1.09745 | 1.0787  | 1.0521  | 0.97268 |
| 0.014                                          | 1                             | 0.9697  | 0.94697 | 0.93182 | 0.90909 |
| 0.017                                          | 1                             | 0.97938 | 0.95876 | 0.90722 | 0.75258 |
| 0.019                                          | 1                             | 0.87931 | 0.81034 | 0.72414 | 0.68621 |
| 0.022                                          | 1                             | 0.93333 | 0.78889 | 0.68889 | 0.62222 |
| 0.025                                          | 1                             | 0.88235 | 0.67647 | 0.58824 | 0.52941 |
| DOX<br>concentração<br>(mg. mL <sup>-1</sup> ) | MATLAB<br>(N/N <sub>0</sub> ) |         |         |         |         |
|                                                | Tempo<br>(min)                |         |         |         |         |
|                                                | 0                             | 30      | 60      | 120     | 180     |
| 0.011                                          | 1                             | 1.6579  | 1.5526  | 1.3816  | 1.3553  |
| 0.014                                          | 1                             | 0.9799  | 0.9517  | 0.8677  | 0.8110  |
| 0.017                                          | 1                             | 0.9237  | 0.8811  | 0.6491  | 0.5965  |
| 0.019                                          | 1                             | 0.8972  | 0.7447  | 0.6064  | 0.5757  |
| 0.022                                          | 1                             | 0.7912  | 0.6541  | 0.4677  | 0.2647  |
| 0.025                                          | 1                             | 0.7600  | 0.5400  | 0.4200  | 0.1400  |

**Dados sobre a medidas das câmaras de cultivo e dos canais**

| Módulos                         | Dispositivo 1  |                 | Dispositivo 2 |                | Dispositivo 3  |           | Dispositivo 4  |                |
|---------------------------------|----------------|-----------------|---------------|----------------|----------------|-----------|----------------|----------------|
|                                 | *Câmaras       | *Canais         | *Câmaras      | *Canais        | *Câmaras       | *Canais   | *Câmaras       | *Canais        |
| 1                               | 4,2            | 2,15            | 4,0           | 2,02           | 4,0            | 2,0       | 4              | 2,0            |
| 2                               | 4,0            | 2,0             | 4,0           | 2,0            | 4,0            | 2,0       | 4              | 2,0            |
| 3                               | 4,0            | 2,02            | 4,12          | 2,2            | 4,0            | 2,0       | 4,1            | 2,21           |
| 4                               | 4,01           | 2,01            | 4,0           | 2,0            | 4,02           | 2,0       | 4              | 2,0            |
| <b>Médias 4<br/>dos módulos</b> | 4,05±<br>0,098 | 2,045±<br>0,070 | 4,03±<br>0,06 | 2,055±<br>0,09 | 4,005±<br>0,01 | 2,0±<br>0 | 4,025±<br>0,05 | 2,052±<br>0,01 |

- Médias das câmaras de cultivo e dos canais por módulo

### Deconvolução dos espectros relativo para cada elemento presente no PDMS e PDMS<sub>LAM</sub>



**Figura 1:** Espectros de XPS de cada elemento presente nos PDMS<sub>LAM</sub> (em azul) PDMS convencional (em vermelho). Foi realizada a deconvolução dos picos, onde pode observar que os espectros para dos elementos da superfície são os mesmo para ambas as amostras (PDMS e PDMA<sub>LAM</sub>). (A) Oxigênio, (B) Silício e (C) Carbono.

### Efeito da transferência de massa na Matriz Extracelular

$$\frac{\partial C_A}{\partial t} + \nabla N_A = R_A$$

Não há reação química, então  $R_A = 0$ ; o fluxo é unidirecional no eixo  $z$ .

$$\overline{N_A} = -D_{ef} \nabla C_A = -D_{AB} \frac{dC_A}{dz}$$

Condições de controle:

- Para  $t = 0$ ,  $C_A = 0, \forall z$ ;
- Para  $t > 0$ ,  $C_A = 0.000025 \text{ g/L}$  if  $z = 0$ ;
- Para  $t > 0$ ,  $\frac{dC_A}{dz} = 0$  if  $z = h$ ;

$h$  = espessura da microcâmara

$D_{AB}$  = Difusividade efetiva

$$\frac{\partial C_A}{\partial t} + \nabla \left( -D_{AB} \frac{dC_A}{dz} \right) = 0$$

No eixo z:

$$\frac{\partial C_A}{\partial t} = D_{AB} \frac{d^2 C_A}{dz^2}$$

Utilizando a modelagem de difusão transiente em um meio semi-infinito e considerando a interface entre a corrente de alimentação (Alimentação constante do componente A =  $C_{Aa}$ ) e a câmara de perfusão, podemos denominar z a distância vertical da interface ao fundo da câmara (espessura constante). Uma vez que a concentração do fluxo de alimentação é essencialmente constante, podemos considerar a câmara de perfusão um meio semi-infinito tal que a concentração  $C(z=0) = C_{Aa}$ .

Se a difusividade efetiva de um componente A do fluxo para o meio da câmara é  $D_{ef}$ , e sua concentração inicial no meio semi-infinito é  $C(t=0) = C_0$ , podemos definir que concentração adimensional  $\theta$  em função do instante concentração  $C(t)$  é  $C_A$ , onde t é o tempo inicial do processo de difusão

$$\theta = \frac{C_A - C_0}{C_{Aa} - C_0}$$

$$C_A = \theta(C_{Aa} - C_0) + C_0$$

E:

$$\theta = 1 - \operatorname{erf}\left[\frac{z}{\sqrt{4D_{ef}t}}\right]$$

Onde:

$$\operatorname{erf}(x) = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_0^x e^{-t^2} dt$$

$$t = 0 \rightarrow \theta = 0 \quad \forall z$$

$$\forall t \neq 0, z = 0 \leftrightarrow \theta = 1$$

$$\forall t \neq 0, z \rightarrow \infty \leftrightarrow \theta \rightarrow 0$$

E:

$$\theta = \frac{C_A - C_{A0}}{C_{Aa} - C_{A0}} = 1 - \operatorname{erf}\left[\frac{z}{\sqrt{4D_{AB}t}}\right]$$

Onde:

$C_0$ : 0 g.mL<sup>-1</sup>

CA:?

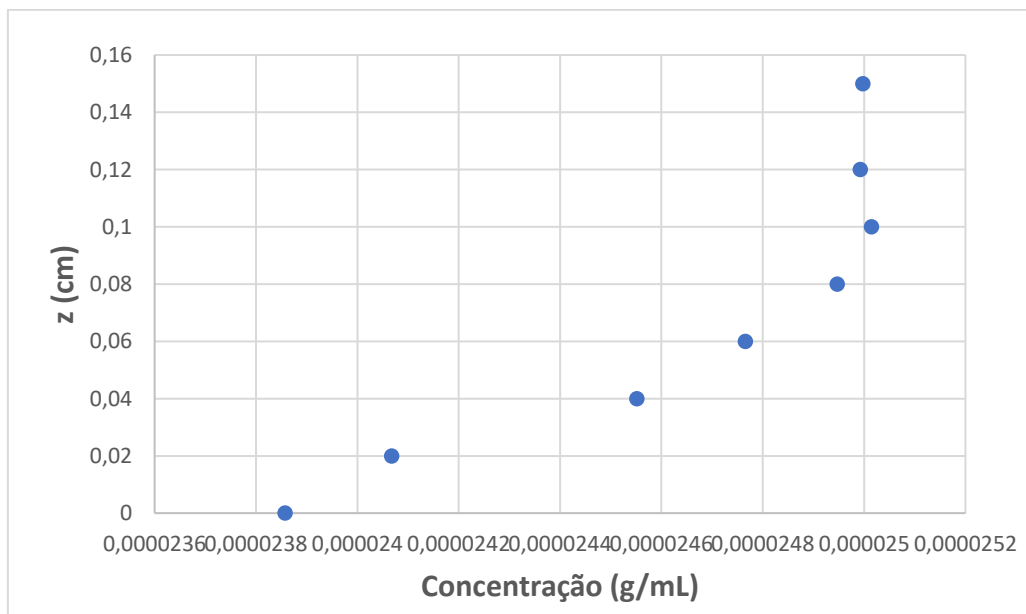
$CA_a: 0.000025 \text{ g.mL}^{-1}$

$D_{AB}: 0.000000395 \text{ cm}^2/\text{s}$

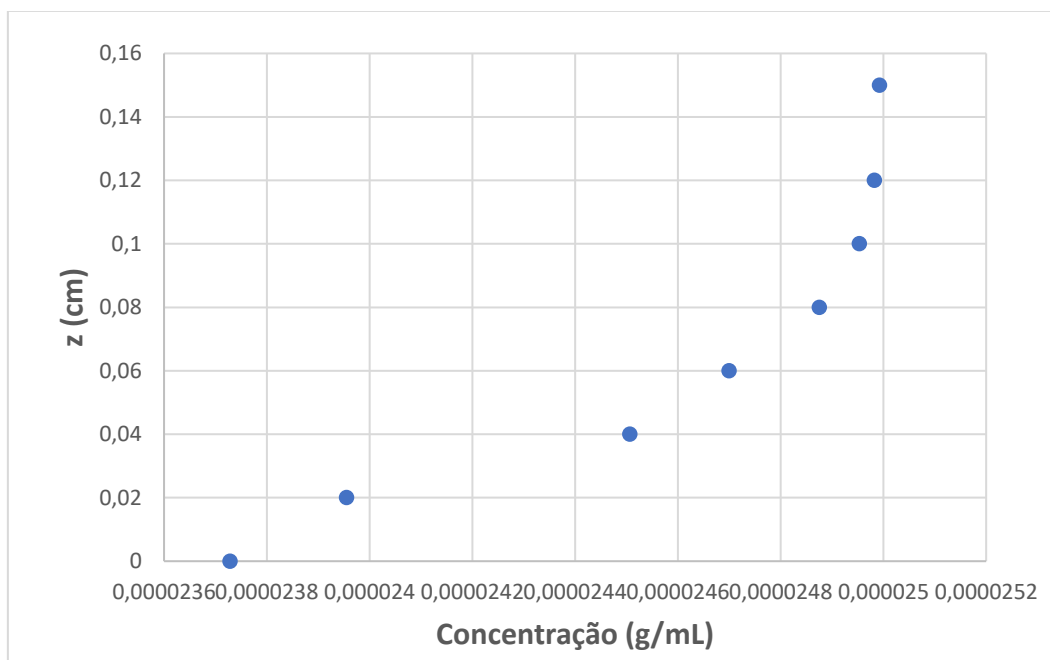
Nos estimamos C(t) para diferentes z, em diferentes tempos e obtemos o perfil para cada tempo:

| z (cm) | t (s) |
|--------|-------|
| 0.15   | 1800  |
| 0.12   |       |
| 0.1    |       |
| 0.08   |       |
| 0.06   | 2700  |
| 0.04   |       |
| 0.02   |       |
| 0      |       |

t=1800s

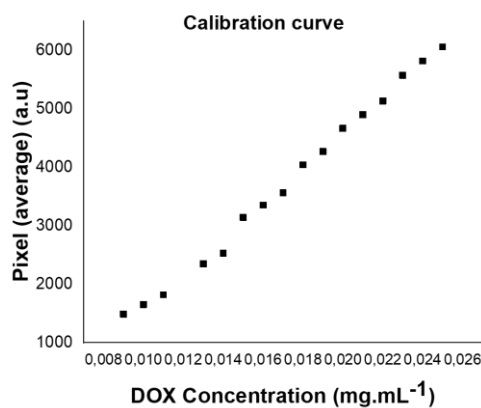


t=2700s:



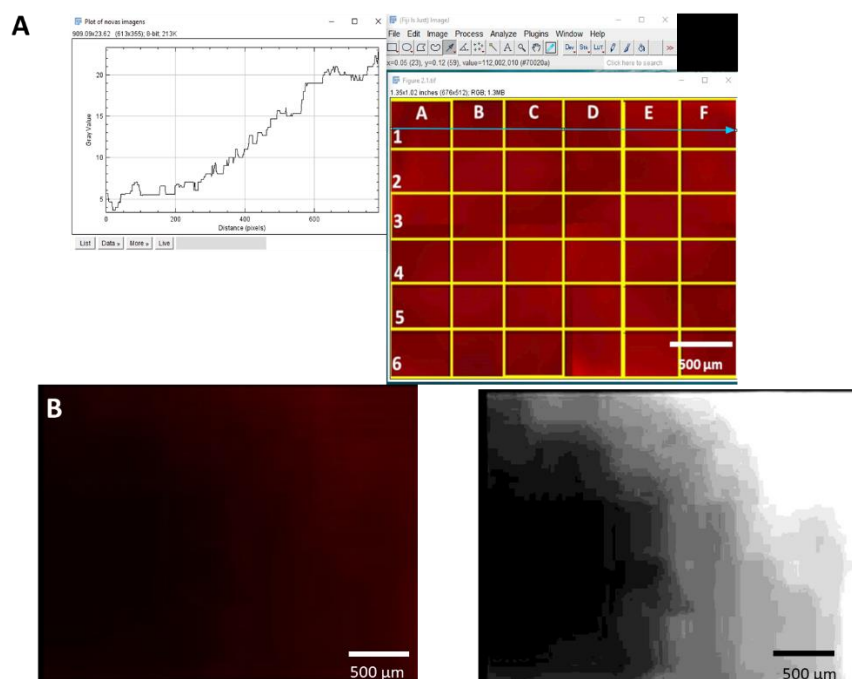
### **Curva Analítica da concentração de DOX versus intensidade de fluorescência (pixels)**

Para esta análise, diferentes concentrações de DOX foram analisadas e a intensidade de fluorescência emitida para cada concentração foi observada por microscopia de fluorescência. (Nikon Ti Eclipse, EUA). A fluorescência correspondente a cada concentração, as imagens foram convertidas para escala de cinza e analisadas no software ImageJ (National Institutes of Health, NIH-USA) para aquisição dos dados. Assim, foi possível obter a curva de analítica, que correlaciona a intensidade do pixel com a concentração de DOX.



**Figura 2:** Perfil da concentração de DOX correspondente a intensidade emitida (in pixels)

### **Gradiente difusivo de DOX no interior das microcâmeras (imagem sem tratamento)**

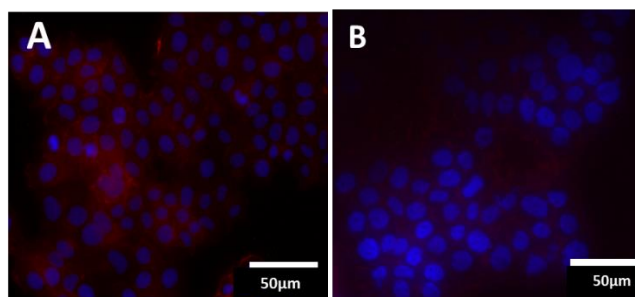


**Figura 3:** Imagens do gradiente difusivo DOX. (A) Perfil do gradiente difusivo DOX (dados brutos). A imagem não foi tratada. (B) Tratamento da imagem e (C) Imagem em escala de cinza. O software ImageJ foi usado para analisar todas as imagens

### **Morfologia das células em placas e em microdispositivo**

A estrutura da célula também foi caracterizada utilizando os probes para marcação nuclear (DAPI / fluorescência em azul – Sigma Adrich, St., Louis, MO, EUA) e citoesqueleto (faloídina / fluorescência em vermelho, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). A observação das células foi realizada utilizando microscopia de fluorescência (NLO-LSM780, Carl Zeiss Oberkochen, Germany) com uma objetiva de 40x, barras de escala = 50 μm.

As células foram cultivadas por 72 h (3 dias), e a concentração inicial de células foi de 60.000 células. mL<sup>-1</sup>. O meio RPMI foi trocado a cada 24 h no microdispositivo e a cada 48 h nas placas Figuras 3 A e B.



**Figure 4:** Morfologia das células no microdispositivo (A) e nas placas (B) foi observada utilizando os marcadores: DAPI para núcleo (azul) e faloidina para citoesqueleto (vermelho). As imagens foram obtidas por microscopia de fluorescência com objetiva de 40x, escala de barras = 50 µm após 72 h.

A morfologia não foi afetada pelo dentro das microcâmeras de cultivo (Figuras. 3 A para células no microdispositivo; e Figuras 3 B, para células na placa). Para analisar este parâmetro, utilizamos os marcadores fluorescentes específicas para o núcleo (DAPI, azul) e o citoesqueleto (faloidina, vermelho). Conforme mostrado na Fig. 3A, após 40 horas as células não apresentavam alterações morfológicas aparentes, apresentando núcleos íntegros e citoesqueletos intactos. Como o microdispositivo é reversível e sua base é de vidro, também foi possível desmontar o microdispositivo após a marcação celular e verificar a estrutura do citoesqueleto (em vermelho, Figura 3 A).

Outro aspecto relevante é que a utilização de lâmina de vidro no microdispositivo (para a base) facilita a visualização em condições de fluorescência que requerem distâncias focais menores, o que por vezes é dificultosa enxergar em placas (Figura 3 B)

#### Calculo IC<sub>50</sub>

Para realizar o cálculo do índice para inibir 50% do crescimento celular, foi obtida a equação não linear do perfil de viabilidade obtido

$$y = p1 \cdot \exp(-x/p2) + p3 + p4 \cdot x$$

Onde

$$p1 = 1,04501 \times 10^7$$

$$p2 = 6,39565 \times 10^{-4}$$

$$p3 = 1,67635$$

$$p4 = -61,90059$$

$$y = 50$$

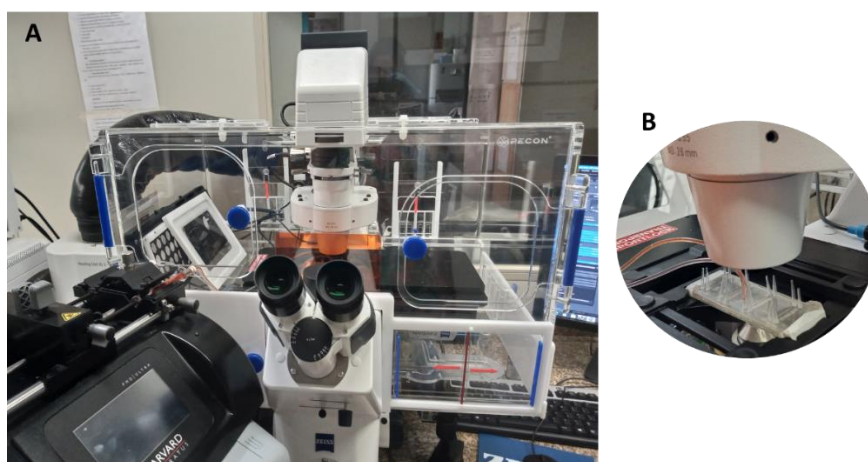
$$50 = 1,04501 \times 10^7 \cdot \exp(-x/6,39565 \times 10^{-4}) + 1,67635 - 61,90059x$$

Resolvendo a equação, obtemos a concentração de DOX necessária para obter o  $IC_{50}$  nas condições adotadas

$$X = 0,022321$$

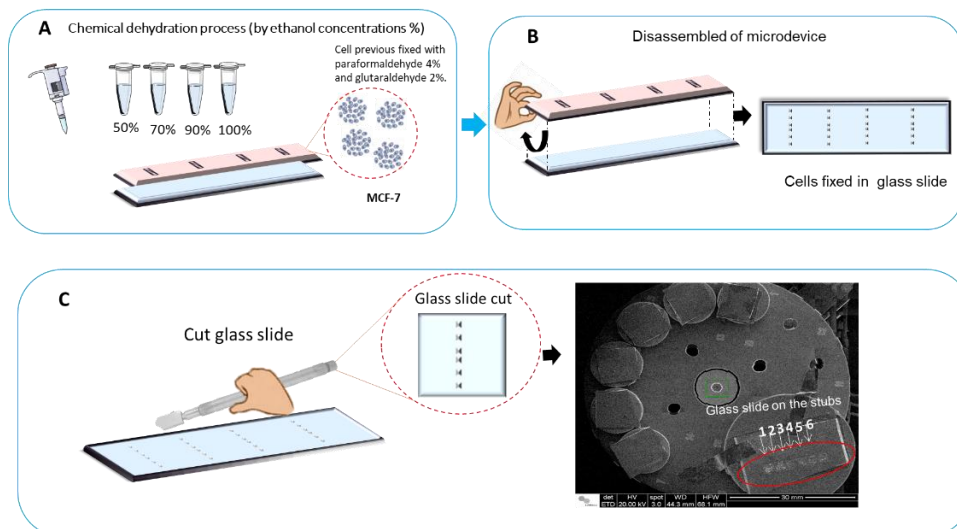
### **Set up do procedimento**

Para compreender melhor como foram realizados os ensaios de *screening* de fármacos, abaixo é apresentada uma imagem do sistema utilizado para os ensaios.



**Figura 5:** Imagem do setup do procedimento do *screening* de fármacos. (A) O microdispositivo foi acoplado em microscópio automatizado com câmara de CO<sub>2</sub> e temperatura controlada (37 °C). O fármaco e o meio de cultivo foram bombeados até o microdispositivo por meio de bomba seringa, com vazão constante de 7  $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ , (B) ampliação mostrando microdispositivo com as devidas conexões, escoando em uma entrada meio e na outra fármaco (DOX), para não haver o descolamento do dispositivo do microscópio, o mesmo foi fixado com fita adesiva,

### **Etapas dos procedimentos para a realização da Microscopia Eletrônica de varredura (MEV) no microdispositivo.**

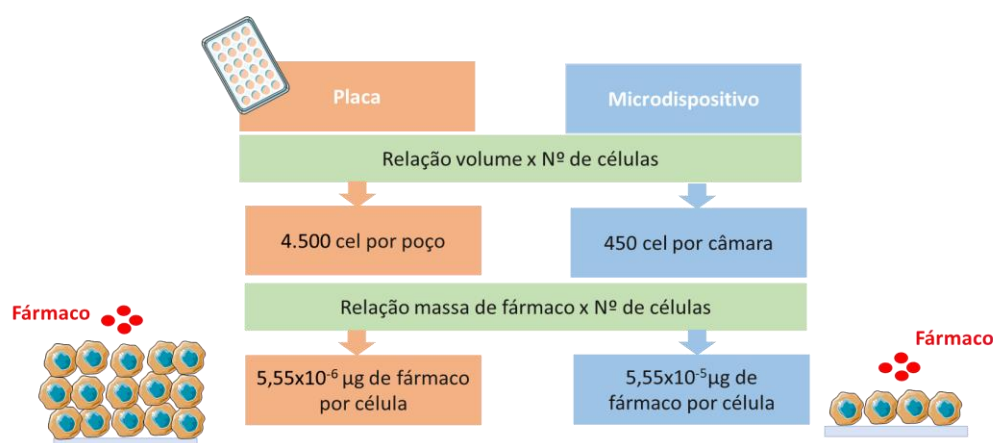


**Figura 6:** Diagrama esquemático da preparação da amostra para análise em MEV. (A) As amostras são fixadas e desidratadas quimicamente no microdispositivo. (B) Após a secagem química, o microdispositivo é desmontado, utilizando-se apenas a base (lâmina de vidro); (C) A lâmina de vidro é cortada e colocada em *stubs* para realização da análise morfológica por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Barra de escala 30 mm.

## Anexo III-Material Suplementar Capítulo 5

### Análise da concentração de fármaco em microdispositivo em placas

Como abordado anteriormente no capítulo 1, a análise em placa e em microdispositivo não são comparáveis devido as diferenças encontradas para o comportamento cinético entre microchips e placas pode estar associada à própria dinâmica entre os cultivos. Os testes realizados em microdispositivo permaneceram por perfusão constante para cada uma das concentrações testadas por 3 h. No caso das placas, as diferentes concentrações de fármacos foram adicionadas, incubadas a 37°C e observadas após 24 h. A análise em placas, é muito semelhante ao um sistema batelada, não podendo ser comparada diretamente com o sistema em perfusão apresentado no microdispositivo. Em placas, além de possuir um volume maior que as microcâmaras apresentadas no microdispositivo, o sistema batelada, não permite que seja suplementado fármaco fresco em diferentes intervalos de tempo, o que ocorre em um sistema de perfusão. Outro aspecto importante é o tempo de observação: o microchip avalia o evento em 3h, enquanto os poços, a avaliação ocorreu em 24h. Além disso, ocorre uma diferença da massa de fármaco para cada um dos sistemas apresentados (Figura 1).

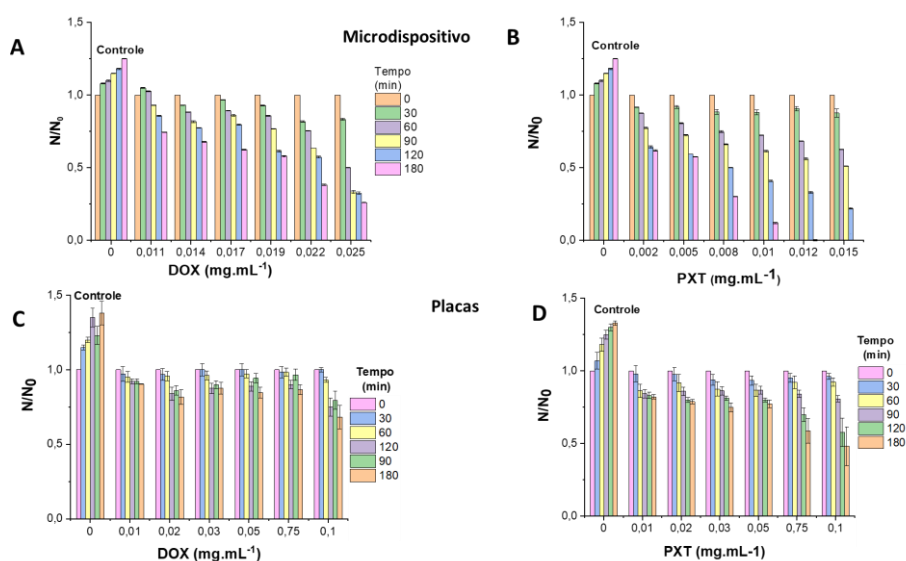


**Figura 1:** Diagrama esquemático ilustrando a relação do volume das áreas de cultivo em placas (4500 cel) e microdispositivos (450 cel) com a densidade celular e a massa de fármaco ( $0,025 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) disponível por células.

Para construir o diagrama da Figura 2, consideramos a concentração de  $0,025 \text{ mg.mL}^{-1}$  de DOX, que foi a concentração mais alta obtida no microdispositivo para conseguir visualizar o gradiente de concentração nos diferentes tempos, como apresentado no Capítulo 2 presente nessa tese. Por ser um sistema estático, na mesma concentração de fármaco ( $0,025 \text{ mg.mL}^{-1}$ ), para volumes diferentes a massa de fármaco disponível por células é menor nas placas que no microdispositivo. Sendo necessário uma concentração maior de fármaco para obter o efeito de inibição celular. A relação densidade de células por volume também deve ser levado em consideração.

Foi observado que para obter o  $\text{IC}_{50}$  nas placas, foi necessário expor as células a uma concentração de  $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$  de DOX, cerca de  $2,2 \times 10^{-5} \mu\text{g}$  de DOX para obter o efeito de morte celular. Comparando com o dispositivo que é de  $5,5 \times 10^{-5} \mu\text{g}$ . As massas de fármacos apresentadas para obter o  $\text{IC}_{50}$ , em ambos os sistemas estão na mesma ordem de grandeza ( $10^{-5}$ ).

A mesma análise foi realizada para o fármaco PXT, onde também foi observado que as concentrações em placa e em microdispositivo para obter o  $\text{IC}_{50}$ , apresentam a mesma ordem de grandeza de massa de fármaco disponível para as células, como pode ser observado na Figura 2.



**Figura 2:** Perfil da viabilidade celular nas concentrações testadas nos diferentes tempos. Os testes foram realizados no microdispositivo (A) e (B) e em placas (C) e (D). A temperatura foi mantida constante a  $37^\circ\text{C}$  durante todo o ensaio. A vazão utilizada para os testes em microdispositivo foi de  $70 \mu\text{L.min}^{-1}$ .

Assim, os testes em placas, serviram para verificar a morfologia das células na presença da concentração de PXT, indicada como IC<sub>50</sub>, e assim comparar morfologicamente se no IC<sub>50</sub> obtido no microdispositivo, apresentava as mesmas características.

### **Calculo IC<sub>50</sub> sem gradiente de concentração**

Novamente, para obter o IC<sub>50</sub> nas novas condições adotadas, foram obtidas as equações das curvas de viabilidade para cada um dos fármacos (PXT e DOX), a partir disso, foram obtidas as concentrações para obter o IC<sub>50</sub>

#### **DOX**

$$y = p1 \cdot \exp(-x/p2) + p3 + p4 \cdot x$$

Onde

$$p1 = 1,042 \times 10^7$$

$$p2 = 6,374 \times 10^{-4}$$

$$p3 = 1,65$$

$$p4 = -60,504$$

$$y = 50$$

$$50 = 1,040 \times 10^7 \cdot \exp(-x/6,374 \times 10^{-4}) + 1,65 - 60,504x$$

$$x = 0,021891$$

#### **PXT**

$$y = A2 + (A1 - A2) / (1 + (x/x_0)^p)$$

Onde:

$$A1 = 0,61911$$

$$A2 = -0,0158$$

$$x_0 = 0,0079$$

$$p = 6,75454$$

$$50 = \frac{-0,0158 + (0,61911 - (-0,0158))}{\left(1 + \frac{x}{0,0079}\right)^{6,75454}}$$

$$x = 0,007846$$

### **Calculo IC<sub>50</sub> com gradiente de concentração**

O mesmo procedimento citado acima, foi realizado após a geração do gradiente de concentração e mensurar o número de célula para cada concentração. Nesse caso, foi fixado o tempo de 180 min e verificado a concentração de cada um dos fármacos para obter o IC<sub>50</sub>.

#### **DOX**

$$y = p1 \cdot \exp(-x/p2) + p3 + p4 \cdot x$$

Onde

$$p1 = 1,045 \times 10^7$$

$$p2 = 6,34 \times 10^{-4}$$

$$p3 = 1,63$$

$$p4 = -61,02$$

$$y = 50$$

$$50 = 1,045 \times 10^7 \cdot \exp(-x/6,34 \times 10^{-4}) + 1,63 - 61,02x$$

$$x = 0,022001$$

#### **PXT**

$$y = A2 + (A1 - A2) / (1 + (x/x_0)^p)$$

Onde:

$$A1 = 0,6005$$

$$A2 = -0,014798$$

$$x_0 = 0,00766$$

$$p = 6,547$$

$$50 = \frac{-0,014798 + (0,6005 - (-0,014798))}{\left(1 + \frac{x}{0,00766}\right)^{6,57}}$$

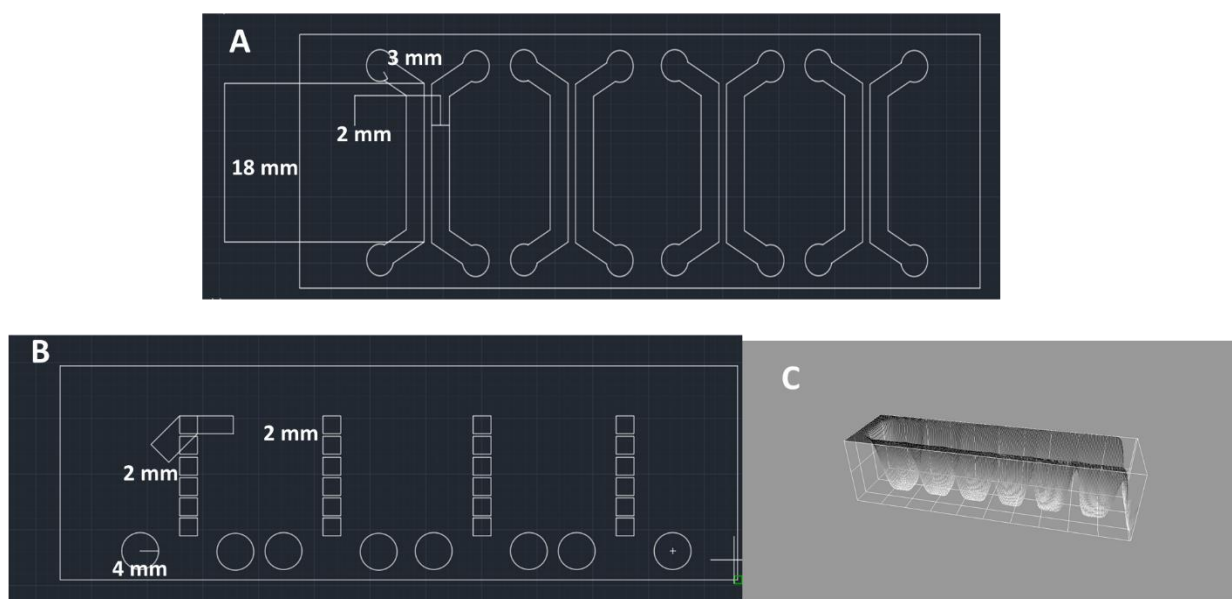
$$x = 0,0075789$$

## Anexo IV- Material Suplementar Capítulo 6

### Média dos raios poços por módulos nos 4 microdispositivos (mm<sup>2</sup>)

| Módulos                     | Dispositivo 1 |           | Dispositivo 2 |            | Dispositivo 3 |           | Dispositivo 4 |           |
|-----------------------------|---------------|-----------|---------------|------------|---------------|-----------|---------------|-----------|
|                             | Poço 1        | Poço 2    | Poço 1        | Poço 2     | Poço 1        | Poço 2    | Poço 1        | Poço 2    |
| 1                           | 4,0           | 4,0       | 4,23          | 4,26       | 4,15          | 4,2       | 4,0           | 4,0       |
| 2                           | 4,2           | 4,0       | 4,0           | 4,12       | 4,12          | 4,12      | 4,0           | 4,2       |
| 3                           | 4,12          | 4,12      | 4,05          | 4,05       | 4,01          | 4,0       | 4,21          | 4,25      |
| 4                           | 4,0           | 4,21      | 4,0           | 4,24       | 4,1           | 4,0       | 4,12          | 4,0       |
| <b>Médias 4 dos módulos</b> | 4,10±0,10     | 4,11±0,11 | 4,02±0,03     | 4,14 ±0,08 | 4,08±0,06     | 4,04±0,07 | 4,11±0,10     | 4,15±0,13 |

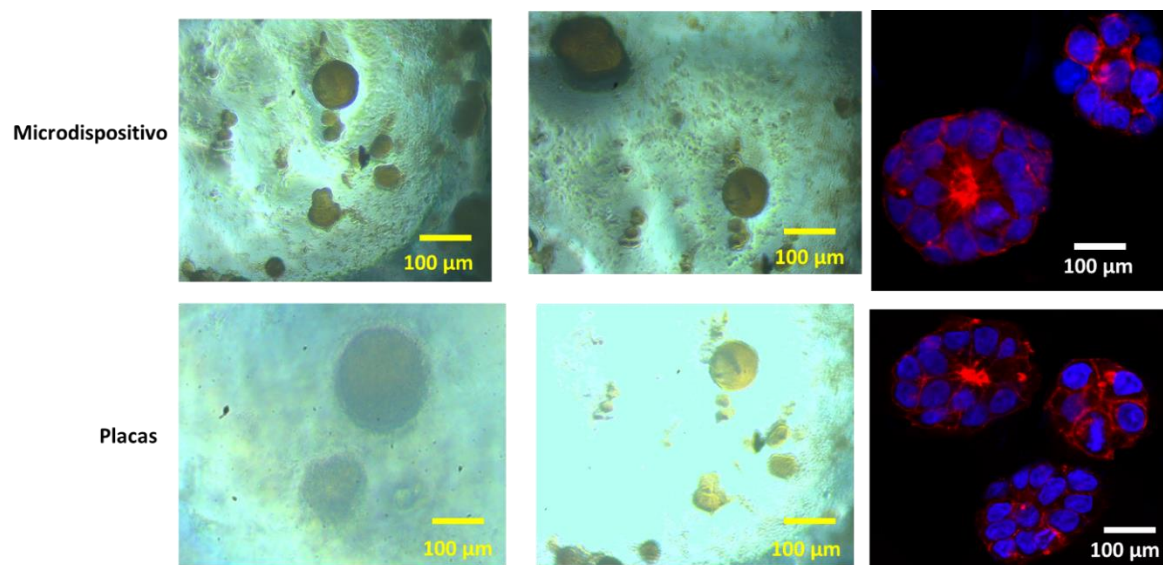
### Projeto do microdispositivo obtido em AutoCad com as cotas



**Figura 1:** Imagem do projeto do microdispositivo. (A) Parte superior com as medidas dos canais; (B) Andar inferior com as medidas das microcâmaras e dos poços de coleta; (C) Altura (1,5 mm) das câmaras de cultivo

Imagem dos esferoides me placas e nas microcâmaras de cultivo (microdispositivo), imagens obtidas em microscopia ótica e em confocal (imagens com marcação). As

imagens comprovam que não há diferenças morfológicas entre os esferoides cultivados em placas e em microdispositivo.



**Figura 2:** Imagens dos esferoides em placas e microcâmaras.

---

## Anexo V- Licenças e Copyrights

---

## ELSEVIER LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Sep 29, 2021

---

---

This Agreement between Fraciele Flores Vit ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.

|                                        |                                                           |
|----------------------------------------|-----------------------------------------------------------|
| License Number                         | 5158011010534                                             |
| License date                           | Sep 29, 2021                                              |
| Licensed Content Publisher             | Elsevier                                                  |
| Licensed Content Publication           | Elsevier Books                                            |
| Licensed Content Title                 | Comprehensive Biotechnology                               |
| Licensed Content Author                | Y.-H. Lin,T.-M. Pan,M.-H. Wu,Amir Kamal Miri,Daniel Nieto |
| Licensed Content Date                  | Jan 1, 2019                                               |
| Licensed Content Pages                 | 19                                                        |
| Start Page                             | 62                                                        |
| End Page                               | 80                                                        |
| Type of Use                            | reuse in a thesis/dissertation                            |
| Portion                                | figures/tables/illustrations                              |
| Number of figures/tables/illustrations | 3                                                         |

Format both print and electronic

Are you the author of this Elsevier chapter? No

Will you be translating? No

Title Microfluidic microdevice to study the behavior cells in the presence of different concentrations of drugs

Institution name University of Campinas

Expected presentation date Dec 2021

Order reference number Figure 3

Portions Figure 3

Fraciele Flores Vit  
Av Anchieta 369-Centro

Requestor Location  
Campinas, São Paulo 13015-101  
Brazil  
Attn: Fraciele Flores Vit

Publisher Tax ID GB 494 6272 12

Total 0.00 USD

Terms and Conditions

### INTRODUCTION

1. The publisher for this copyrighted material is Elsevier. By clicking "accept" in connection with completing this licensing transaction, you agree that the following terms and conditions apply to this transaction (along with the Billing and Payment terms and conditions established by Copyright Clearance Center, Inc. ("CCC"), at the time that you opened your Rightslink account and that are available at any time at <http://myaccount.copyright.com>).

### GENERAL TERMS

2. Elsevier hereby grants you permission to reproduce the aforementioned material subject to the terms and conditions indicated.

3. Acknowledgement: If any part of the material to be used (for example, figures) has appeared in our publication with credit or acknowledgement to another source, permission must also be sought from that source. If such permission is not obtained then that material may not be included in your publication/copies. Suitable acknowledgement to the source must be made, either as a footnote or in a reference list at the end of your publication, as follows:

"Reprinted from Publication title, Vol /edition number, Author(s), Title of article / title of chapter, Pages No., Copyright (Year), with permission from Elsevier [OR APPLICABLE SOCIETY COPYRIGHT OWNER]." Also Lancet special credit - "Reprinted from The Lancet, Vol. number, Author(s), Title of article, Pages No., Copyright (Year), with permission from Elsevier."

4. Reproduction of this material is confined to the purpose and/or media for which permission is hereby given.

5. Altering/Modifying Material: Not Permitted. However figures and illustrations may be altered/adapted minimally to serve your work. Any other abbreviations, additions, deletions and/or any other alterations shall be made only with prior written authorization of Elsevier Ltd. (Please contact Elsevier's permissions helpdesk [here](#)). No modifications can be made to any Lancet figures/tables and they must be reproduced in full.

6. If the permission fee for the requested use of our material is waived in this instance, please be advised that your future requests for Elsevier materials may attract a fee.

7. Reservation of Rights: Publisher reserves all rights not specifically granted in the combination of (i) the license details provided by you and accepted in the course of this licensing transaction, (ii) these terms and conditions and (iii) CCC's Billing and Payment terms and conditions.

8. License Contingent Upon Payment: While you may exercise the rights licensed immediately upon issuance of the license at the end of the licensing process for the transaction, provided that you have disclosed complete and accurate details of your proposed use, no license is finally effective unless and until full payment is received from you (either by publisher or by CCC) as provided in CCC's Billing and Payment terms and conditions. If full payment is not received on a timely basis, then any license preliminarily granted shall be deemed automatically revoked and shall be void as if never granted. Further, in the event that you breach any of these terms and conditions or any of CCC's Billing and Payment terms and conditions, the license is automatically revoked and shall be void as if never granted. Use of materials as described in a revoked license, as well as any use of the materials beyond the scope of an unrevoked license, may constitute copyright infringement and publisher reserves the right to take any and all action to protect its copyright in the materials.

9. Warranties: Publisher makes no representations or warranties with respect to the licensed material.

10. Indemnity: You hereby indemnify and agree to hold harmless publisher and CCC, and their respective officers, directors, employees and agents, from and against any and all claims arising out of your use of the licensed material other than as specifically authorized pursuant to this license.

11. No Transfer of License: This license is personal to you and may not be sublicensed, assigned, or transferred by you to any other person without publisher's written permission.

12. No Amendment Except in Writing: This license may not be amended except in a writing signed by both parties (or, in the case of publisher, by CCC on publisher's behalf).

13. **Objection to Contrary Terms:** Publisher hereby objects to any terms contained in any purchase order, acknowledgment, check endorsement or other writing prepared by you, which terms are inconsistent with these terms and conditions or CCC's Billing and Payment terms and conditions. These terms and conditions, together with CCC's Billing and Payment terms and conditions (which are incorporated herein), comprise the entire agreement between you and publisher (and CCC) concerning this licensing transaction. In the event of any conflict between your obligations established by these terms and conditions and those established by CCC's Billing and Payment terms and conditions, these terms and conditions shall control.

14. **Revocation:** Elsevier or Copyright Clearance Center may deny the permissions described in this License at their sole discretion, for any reason or no reason, with a full refund payable to you. Notice of such denial will be made using the contact information provided by you. Failure to receive such notice will not alter or invalidate the denial. In no event will Elsevier or Copyright Clearance Center be responsible or liable for any costs, expenses or damage incurred by you as a result of a denial of your permission request, other than a refund of the amount(s) paid by you to Elsevier and/or Copyright Clearance Center for denied permissions.

### LIMITED LICENSE

The following terms and conditions apply only to specific license types:

15. **Translation:** This permission is granted for non-exclusive world **English** rights only unless your license was granted for translation rights. If you licensed translation rights you may only translate this content into the languages you requested. A professional translator must perform all translations and reproduce the content word for word preserving the integrity of the article.

16. **Posting licensed content on any Website:** The following terms and conditions apply as follows: Licensing material from an Elsevier journal: All content posted to the web site must maintain the copyright information line on the bottom of each image; A hyper-text must be included to the Homepage of the journal from which you are licensing at <http://www.sciencedirect.com/science/journal/xxxxx> or the Elsevier homepage for books at <http://www.elsevier.com>; Central Storage: This license does not include permission for a scanned version of the material to be stored in a central repository such as that provided by Heron/XanEdu.

Licensing material from an Elsevier book: A hyper-text link must be included to the Elsevier homepage at <http://www.elsevier.com>. All content posted to the web site must maintain the copyright information line on the bottom of each image.

**Posting licensed content on Electronic reserve:** In addition to the above the following clauses are applicable: The web site must be password-protected and made available only to bona fide students registered on a relevant course. This permission is granted for 1 year only. You may obtain a new license for future website posting.

17. **For journal authors:** the following clauses are applicable in addition to the above:

#### Preprints:

A preprint is an author's own write-up of research results and analysis, it has not been peer-reviewed, nor has it had any other value added to it by a publisher (such as formatting, copyright, technical enhancement etc.).

Authors can share their preprints anywhere at any time. Preprints should not be added to or enhanced in any way in order to appear more like, or to substitute for, the final versions of

articles however authors can update their preprints on arXiv or RePEc with their Accepted Author Manuscript (see below).

If accepted for publication, we encourage authors to link from the preprint to their formal publication via its DOI. Millions of researchers have access to the formal publications on ScienceDirect, and so links will help users to find, access, cite and use the best available version. Please note that Cell Press, The Lancet and some society-owned have different preprint policies. Information on these policies is available on the journal homepage.

**Accepted Author Manuscripts:** An accepted author manuscript is the manuscript of an article that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and editor-author communications.

Authors can share their accepted author manuscript:

- immediately
  - via their non-commercial person homepage or blog
  - by updating a preprint in arXiv or RePEc with the accepted manuscript
  - via their research institute or institutional repository for internal institutional uses or as part of an invitation-only research collaboration work-group
  - directly by providing copies to their students or to research collaborators for their personal use
  - for private scholarly sharing as part of an invitation-only work group on commercial sites with which Elsevier has an agreement
- After the embargo period
  - via non-commercial hosting platforms such as their institutional repository
  - via commercial sites with which Elsevier has an agreement

In all cases accepted manuscripts should:

- link to the formal publication via its DOI
- bear a CC-BY-NC-ND license - this is easy to do
- if aggregated with other manuscripts, for example in a repository or other site, be shared in alignment with our hosting policy not be added to or enhanced in any way to appear more like, or to substitute for, the published journal article.

**Published journal article (JPA):** A published journal article (PJA) is the definitive final record of published research that appears or will appear in the journal and embodies all value-adding publishing activities including peer review co-ordination, copy-editing, formatting, (if relevant) pagination and online enrichment.

Policies for sharing publishing journal articles differ for subscription and gold open access articles:

**Subscription Articles:** If you are an author, please share a link to your article rather than the full-text. Millions of researchers have access to the formal publications on ScienceDirect, and so links will help your users to find, access, cite, and use the best available version.

Theses and dissertations which contain embedded PJAs as part of the formal submission can be posted publicly by the awarding institution with DOI links back to the formal publications on ScienceDirect.

If you are affiliated with a library that subscribes to ScienceDirect you have additional private sharing rights for others' research accessed under that agreement. This includes use for classroom teaching and internal training at the institution (including use in course packs and courseware programs), and inclusion of the article for grant funding purposes.

**Gold Open Access Articles:** May be shared according to the author-selected end-user license and should contain a [CrossMark logo](#), the end user license, and a DOI link to the formal publication on ScienceDirect.

Please refer to Elsevier's [posting.policy](#) for further information.

**18. For book authors** the following clauses are applicable in addition to the above: Authors are permitted to place a brief summary of their work online only. You are not allowed to download and post the published electronic version of your chapter, nor may you scan the printed edition to create an electronic version. **Posting to a repository:** Authors are permitted to post a summary of their chapter only in their institution's repository.

**19. Thesis/Dissertation:** If your license is for use in a thesis/dissertation your thesis may be submitted to your institution in either print or electronic form. Should your thesis be published commercially, please reapply for permission. These requirements include permission for the Library and Archives of Canada to supply single copies, on demand, of the complete thesis and include permission for Proquest/UMI to supply single copies, on demand, of the complete thesis. Should your thesis be published commercially, please reapply for permission. Theses and dissertations which contain embedded PJAs as part of the formal submission can be posted publicly by the awarding institution with DOI links back to the formal publications on ScienceDirect.

### **Elsevier Open Access Terms and Conditions**

You can publish open access with Elsevier in hundreds of open access journals or in nearly 2000 established subscription journals that support open access publishing. Permitted third party re-use of these open access articles is defined by the author's choice of Creative Commons user license. See our [open access license policy](#) for more information.

#### **Terms & Conditions applicable to all Open Access articles published with Elsevier:**

Any reuse of the article must not represent the author as endorsing the adaptation of the article nor should the article be modified in such a way as to damage the author's honour or reputation. If any changes have been made, such changes must be clearly indicated.

The author(s) must be appropriately credited and we ask that you include the end user license and a DOI link to the formal publication on ScienceDirect.

If any part of the material to be used (for example, figures) has appeared in our publication with credit or acknowledgement to another source it is the responsibility of the user to ensure their reuse complies with the terms and conditions determined by the rights holder.

#### **Additional Terms & Conditions applicable to each Creative Commons user license:**

**CC BY:** The CC-BY license allows users to copy, to create extracts, abstracts and new works from the Article, to alter and revise the Article and to make commercial use of the Article (including reuse and/or resale of the Article by commercial entities), provided the user gives appropriate credit (with a link to the formal publication through the relevant DOI), provides a link to the license, indicates if changes were made and the licensor is not represented as endorsing the use made of the work. The full details of the license are available at <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>.

**CC BY NC SA:** The CC BY-NC-SA license allows users to copy, to create extracts, abstracts and new works from the Article, to alter and revise the Article, provided this is not done for commercial purposes, and that the user gives appropriate credit (with a link to the formal publication through the relevant DOI), provides a link to the license, indicates if changes were made and the licensor is not represented as endorsing the use made of the

work. Further, any new works must be made available on the same conditions. The full details of the license are available at <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0>.

**CC BY NC ND:** The CC BY-NC-ND license allows users to copy and distribute the Article, provided this is not done for commercial purposes and further does not permit distribution of the Article if it is changed or edited in any way, and provided the user gives appropriate credit (with a link to the formal publication through the relevant DOI), provides a link to the license, and that the licensor is not represented as endorsing the use made of the work. The full details of the license are available at <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0>. Any commercial reuse of Open Access articles published with a CC BY NC SA or CC BY NC ND license requires permission from Elsevier and will be subject to a fee.

Commercial reuse includes:

- Associating advertising with the full text of the Article
- Charging fees for document delivery or access
- Article aggregation
- Systematic distribution via e-mail lists or share buttons

Posting or linking by commercial companies for use by customers of those companies.

## 20. Other Conditions:

v1.10

Questions? [customercare@copyright.com](mailto:customercare@copyright.com) or +1-855-239-3415 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.

---

---

## SPRINGER NATURE LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Sep 29, 2021

---

---

This Agreement between Fraciele Flores Vit ("You") and Springer Nature ("Springer Nature") consists of your license details and the terms and conditions provided by Springer Nature and Copyright Clearance Center.

License Number 5158011285587

License date Sep 29, 2021

Licensed Content  
Publisher Springer Nature

Licensed Content  
Publication Microfluids and Nanofluids

Licensed Content Title Rapid prototyping of PMMA microfluidic chips utilizing a CO2 laser

Licensed Content Author Ting-Fu Hong et al

Licensed Content Date May 26, 2010

Type of Use Thesis/Dissertation

Requestor type academic/university or research institute

Format print and electronic

Portion figures/tables/illustrations

Number of  
figures/tables/illustrations 1

Will you be translating? no

Circulation/distribution 100 - 199

Author of this Springer  
Nature content no

Title Microfluidic microdevice to study the behavior cells in the  
presence of different concentrations of drugs

Institution name University of Campinas

Expected presentation  
date Dec 2021

Order reference number Figure 2

Portions Figure 2

Fraciele Flores Vit  
Av Anchieta 369-Centro

Requestor Location  
Campinas, São Paulo 13015-101  
Brazil  
Attn: Fraciele Flores Vit

Total 0.00 USD

Terms and Conditions

### **Springer Nature Customer Service Centre GmbH Terms and Conditions**

This agreement sets out the terms and conditions of the licence (the **Licence**) between you and **Springer Nature Customer Service Centre GmbH** (the **Licensor**). By clicking 'accept' and completing the transaction for the material (**Licensed Material**), you also confirm your acceptance of these terms and conditions.

#### **1. Grant of License**

**1. 1.** The Licensor grants you a personal, non-exclusive, non-transferable, world-wide licence to reproduce the Licensed Material for the purpose specified in your order only. Licences are granted for the specific use requested in the order and for no other use, subject to the conditions below.

**1. 2.** The Licensor warrants that it has, to the best of its knowledge, the rights to license reuse of the Licensed Material. However, you should ensure that the material you are requesting is original to the Licensor and does not carry the copyright of

another entity (as credited in the published version).

**1. 3.** If the credit line on any part of the material you have requested indicates that it was reprinted or adapted with permission from another source, then you should also seek permission from that source to reuse the material.

## 2. Scope of Licence

**2. 1.** You may only use the Licensed Content in the manner and to the extent permitted by these Ts&Cs and any applicable laws.

**2. 2.** A separate licence may be required for any additional use of the Licensed Material, e.g. where a licence has been purchased for print only use, separate permission must be obtained for electronic re-use. Similarly, a licence is only valid in the language selected and does not apply for editions in other languages unless additional translation rights have been granted separately in the licence. Any content owned by third parties are expressly excluded from the licence.

**2. 3.** Similarly, rights for additional components such as custom editions and derivatives require additional permission and may be subject to an additional fee.

Please apply to

[Journalpermissions@springernature.com](mailto:Journalpermissions@springernature.com)/[bookpermissions@springernature.com](mailto:bookpermissions@springernature.com) for these rights.

**2. 4.** Where permission has been granted **free of charge** for material in print, permission may also be granted for any electronic version of that work, provided that the material is incidental to your work as a whole and that the electronic version is essentially equivalent to, or substitutes for, the print version.

**2. 5.** An alternative scope of licence may apply to signatories of the [STM Permissions Guidelines](#), as amended from time to time.

## 3. Duration of Licence

**3. 1.** A licence for is valid from the date of purchase ('Licence Date') at the end of the relevant period in the below table:

| Scope of Licence   | Duration of Licence                               |
|--------------------|---------------------------------------------------|
| Post on a website  | 12 months                                         |
| Presentations      | 12 months                                         |
| Books and journals | Lifetime of the edition in the language purchased |

## 4. Acknowledgement

**4. 1.** The Licensor's permission must be acknowledged next to the Licenced Material in print. In electronic form, this acknowledgement must be visible at the same time as the figures/tables/illustrations or abstract, and must be hyperlinked to the journal/book's homepage. Our required acknowledgement format is in the Appendix below.

## 5. Restrictions on use

**5. 1.** Use of the Licensed Material may be permitted for incidental promotional use and minor editing privileges e.g. minor adaptations of single figures, changes of format, colour and/or style where the adaptation is credited as set out in Appendix 1 below. Any other changes including but not limited to, cropping, adapting, omitting material that affect the meaning, intention or moral rights of the author are strictly prohibited.

**5. 2.** You must not use any Licensed Material as part of any design or trademark.

**5. 3.** Licensed Material may be used in Open Access Publications (OAP) before publication by Springer Nature, but any Licensed Material must be removed from OAP sites prior to final publication.

## 6. Ownership of Rights

**6. 1.** Licensed Material remains the property of either Licensor or the relevant third party and any rights not explicitly granted herein are expressly reserved.

## 7. Warranty

IN NO EVENT SHALL LICENSOR BE LIABLE TO YOU OR ANY OTHER PARTY OR ANY OTHER PERSON OR FOR ANY SPECIAL, CONSEQUENTIAL, INCIDENTAL OR INDIRECT DAMAGES, HOWEVER CAUSED, ARISING OUT OF OR IN CONNECTION WITH THE DOWNLOADING, VIEWING OR USE OF THE MATERIALS REGARDLESS OF THE FORM OF ACTION, WHETHER FOR BREACH OF CONTRACT, BREACH OF WARRANTY, TORT, NEGLIGENCE, INFRINGEMENT OR OTHERWISE (INCLUDING, WITHOUT LIMITATION, DAMAGES BASED ON LOSS OF PROFITS, DATA, FILES, USE, BUSINESS OPPORTUNITY OR CLAIMS OF THIRD PARTIES), AND WHETHER OR NOT THE PARTY HAS BEEN ADVISED OF THE POSSIBILITY OF SUCH DAMAGES. THIS LIMITATION SHALL APPLY NOTWITHSTANDING ANY FAILURE OF ESSENTIAL PURPOSE OF ANY LIMITED REMEDY PROVIDED HEREIN.

## 8. Limitations

**8. 1. BOOKS ONLY:** Where 'reuse in a dissertation/thesis' has been selected the following terms apply: Print rights of the final author's accepted manuscript (for clarity, NOT the published version) for up to 100 copies, electronic rights for use only on a personal website or institutional repository as defined by the Sherpa guideline ([www.sherpa.ac.uk/romeo/](http://www.sherpa.ac.uk/romeo/)).

**8. 2.** For content reuse requests that qualify for permission under the [STM Permissions Guidelines](#), which may be updated from time to time, the STM Permissions Guidelines supersede the terms and conditions contained in this licence.

## 9. Termination and Cancellation

**9. 1.** Licences will expire after the period shown in Clause 3 (above).

**9. 2.** Licensee reserves the right to terminate the Licence in the event that payment is not received in full or if there has been a breach of this agreement by you.

## **Appendix 1 — Acknowledgements:**

### **For Journal Content:**

Reprinted by permission from [the Licensor]: [Journal Publisher (e.g. Nature/Springer/Palgrave)] [JOURNAL NAME] [REFERENCE CITATION (Article name, Author(s) Name), [COPYRIGHT] (year of publication)]

### **For Advance Online Publication papers:**

Reprinted by permission from [the Licensor]: [Journal Publisher (e.g. Nature/Springer/Palgrave)] [JOURNAL NAME] [REFERENCE CITATION (Article name, Author(s) Name), [COPYRIGHT] (year of publication), advance online publication, day month year (doi: 10.1038/sj.[JOURNAL ACRONYM].)]

### **For Adaptations/Translations:**

Adapted/Translated by permission from [the Licensor]: [Journal Publisher (e.g. Nature/Springer/Palgrave)] [JOURNAL NAME] [REFERENCE CITATION (Article name, Author(s) Name), [COPYRIGHT] (year of publication)]

### **Note: For any republication from the British Journal of Cancer, the following credit line style applies:**

Reprinted/adapted/translated by permission from [the Licensor]: on behalf of Cancer Research UK: : [Journal Publisher (e.g. Nature/Springer/Palgrave)] [JOURNAL NAME] [REFERENCE CITATION (Article name, Author(s) Name), [COPYRIGHT] (year of publication)]

### **For Advance Online Publication papers:**

Reprinted by permission from The [the Licensor]: on behalf of Cancer Research UK: [Journal Publisher (e.g. Nature/Springer/Palgrave)] [JOURNAL NAME] [REFERENCE CITATION (Article name, Author(s) Name), [COPYRIGHT] (year of publication), advance online publication, day month year (doi: 10.1038/sj.[JOURNAL ACRONYM].)]

### **For Book content:**

Reprinted/adapted by permission from [the Licensor]: [Book Publisher (e.g. Palgrave Macmillan, Springer etc)] [Book Title] by [Book author(s)] [COPYRIGHT] (year of publication)]

## **Other Conditions:**

Version 1.3

Questions? [customercare@copyright.com](mailto:customercare@copyright.com) or +1-855-239-3415 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.

This page is available in the following languages:



# Creative Commons License Deed

**Attribution 4.0 International (CC BY 4.0)**



This is a human-readable summary of (and not a substitute for) the [license](#).

## You are free to:

**Share** — copy and redistribute the material in any medium or format

**Adapt** — remix, transform, and build upon the material

for any purpose, even commercially.

The licensor cannot revoke these freedoms as long as you follow the license terms.

## Under the following terms:

**Attribution** — You must give appropriate credit, provide a link to the license, and indicate if changes were made. You may do so in any reasonable manner, but not in any way that suggests the licensor endorses you or your use.

**No additional restrictions** — You may not apply legal terms or technological measures that legally restrict others from doing anything the license permits.

## Notices:

You do not have to comply with the license for elements of the material in the public domain or where your use is permitted by an applicable exception or limitation.

No warranties are given. The license may not give you all of the permissions necessary for your intended use. For example, other rights such as publicity, privacy, or moral rights may limit how you use the material.



This is a License Agreement between Franciele Flores Vit ("User") and Copyright Clearance Center, Inc. ("CCC") on behalf of the Rightsholder identified in the order details below. The license consists of the order details, the CCC Terms and Conditions below, and any Rightsholder Terms and Conditions which are included below.

All payments must be made in full to CCC in accordance with the CCC Terms and Conditions below.

|                  |             |             |                                    |
|------------------|-------------|-------------|------------------------------------|
| Order Date       | 29-Sep-2021 | Type of Use | Republish in a thesis/dissertation |
| Order License ID | 1069624-3   | Publisher   | ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY         |
| ISSN             | 1473-0189   | Portion     | Image/photo/illustration           |

## LICENSED CONTENT

|                   |                                                                                        |                  |                                                             |
|-------------------|----------------------------------------------------------------------------------------|------------------|-------------------------------------------------------------|
| Publication Title | Lab on a chip                                                                          | Rightsholder     | Royal Society of Chemistry                                  |
| Article Title     | The microfluidic palette: a diffusive gradient generator with spatio-temporal control. | Publication Type | e-Journal                                                   |
|                   |                                                                                        | Start Page       | 2707                                                        |
|                   |                                                                                        | Issue            | 18                                                          |
| Author/Editor     | Royal Society of Chemistry (Great Britain)                                             | Volume           | 9                                                           |
|                   |                                                                                        | URL              | <a href="http://www.rsc.org/loc">http://www.rsc.org/loc</a> |
| Date              | 01/01/2001                                                                             |                  |                                                             |
| Language          | English                                                                                |                  |                                                             |
| Country           | United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland                                   |                  |                                                             |

## REQUEST DETAILS

|                                           |                          |                             |                                  |
|-------------------------------------------|--------------------------|-----------------------------|----------------------------------|
| Portion Type                              | Image/photo/illustration | Distribution                | Worldwide                        |
| Number of images / photos / illustrations | 1                        | Translation                 | Original language of publication |
| Format (select all that apply)            | Print, Electronic        | Copies for the disabled?    | No                               |
| Who will republish the content?           | Academic institution     | Minor editing privileges?   | Yes                              |
| Duration of Use                           | Life of current edition  | Incidental promotional use? | No                               |
| Lifetime Unit Quantity                    | Up to 499                | Currency                    | USD                              |
| Rights Requested                          | Main product             |                             |                                  |

## NEW WORK DETAILS

|                 |                                                                                                           |                            |                        |
|-----------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------|------------------------|
| Title           | Microfluidic microdevice to study the behavior cells in the presence of different concentrations of drugs | Institution name           | University of Campinas |
|                 |                                                                                                           | Expected presentation date | 2021-12-08             |
| Instructor name | Lucimara Gaziola de la Torre                                                                              |                            |                        |

## ADDITIONAL DETAILS

|                        |     |
|------------------------|-----|
| Order reference number | N/A |
|------------------------|-----|

The requesting person /  
organization to appear  
on the license

Franciele Flores Vit

## REUSE CONTENT DETAILS

|                                                                 |                                                        |                                                        |                                                                                                  |
|-----------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title, description or<br>numeric reference of the<br>portion(s) | Figure 1                                               | Title of the<br>article/chapter the<br>portion is from | The microfluidic palette: a<br>diffusive gradient<br>generator with spatio-<br>temporal control. |
| Editor of portion(s)                                            | Atencia, Javier; Morrow,<br>Jayne; Locascio, Laurie E. | Author of portion(s)                                   | Atencia, Javier; Morrow,<br>Jayne; Locascio, Laurie E.                                           |
| Volume of serial or<br>monograph                                | 9                                                      | Issue, if republishing an<br>article from a serial     | 18                                                                                               |
| Page or page range of<br>portion                                | 2707                                                   | Publication date of<br>portion                         | 2009-09-21                                                                                       |

## CCC Terms and Conditions

1. Description of Service; Defined Terms. This Republication License enables the User to obtain licenses for republication of one or more copyrighted works as described in detail on the relevant Order Confirmation (the "Work(s)"). Copyright Clearance Center, Inc. ("CCC") grants licenses through the Service on behalf of the rightsholder identified on the Order Confirmation (the "Rightsholder"). "Republication", as used herein, generally means the inclusion of a Work, in whole or in part, in a new work or works, also as described on the Order Confirmation. "User", as used herein, means the person or entity making such republication.
2. The terms set forth in the relevant Order Confirmation, and any terms set by the Rightsholder with respect to a particular Work, govern the terms of use of Works in connection with the Service. By using the Service, the person transacting for a republication license on behalf of the User represents and warrants that he/she/it (a) has been duly authorized by the User to accept, and hereby does accept, all such terms and conditions on behalf of User, and (b) shall inform User of all such terms and conditions. In the event such person is a "freelancer" or other third party independent of User and CCC, such party shall be deemed jointly a "User" for purposes of these terms and conditions. In any event, User shall be deemed to have accepted and agreed to all such terms and conditions if User republishes the Work in any fashion.
3. Scope of License; Limitations and Obligations.
  - 3.1. All Works and all rights therein, including copyright rights, remain the sole and exclusive property of the Rightsholder. The license created by the exchange of an Order Confirmation (and/or any invoice) and payment by User of the full amount set forth on that document includes only those rights expressly set forth in the Order Confirmation and in these terms and conditions, and conveys no other rights in the Work(s) to User. All rights not expressly granted are hereby reserved.
  - 3.2. General Payment Terms: You may pay by credit card or through an account with us payable at the end of the month. If you and we agree that you may establish a standing account with CCC, then the following terms apply: Remit Payment to: Copyright Clearance Center, 29118 Network Place, Chicago, IL 60673-1291. Payments Due: Invoices are payable upon their delivery to you (or upon our notice to you that they are available to you for downloading). After 30 days, outstanding amounts will be subject to a service charge of 1-1/2% per month or, if less, the maximum rate allowed by applicable law. Unless otherwise specifically set forth in the Order Confirmation or in a separate written agreement signed by CCC, invoices are due and payable on "net 30" terms. While User may exercise the rights licensed immediately upon issuance of the Order Confirmation, the license is automatically revoked and is null and void, as if it had never been issued, if complete payment for the license is not received on a timely basis either from User directly or through a payment agent, such as a credit card company.
  - 3.3. Unless otherwise provided in the Order Confirmation, any grant of rights to User (i) is "one-time" (including the editions and product family specified in the license), (ii) is non-exclusive and non-transferable and (iii) is subject to any and all limitations and restrictions (such as, but not limited to, limitations on duration of use or circulation) included in the Order Confirmation or invoice and/or in these terms and conditions. Upon completion of the licensed use, User shall either secure a new permission for further use of the Work(s) or immediately cease any new use of the Work(s) and shall render inaccessible (such as by

deleting or by removing or severing links or other locators) any further copies of the Work (except for copies printed on paper in accordance with this license and still in User's stock at the end of such period).

- 3.4. In the event that the material for which a republication license is sought includes third party materials (such as photographs, illustrations, graphs, inserts and similar materials) which are identified in such material as having been used by permission, User is responsible for identifying, and seeking separate licenses (under this Service or otherwise) for, any of such third party materials; without a separate license, such third party materials may not be used.
- 3.5. Use of proper copyright notice for a Work is required as a condition of any license granted under the Service. Unless otherwise provided in the Order Confirmation, a proper copyright notice will read substantially as follows: "Republished with permission of [Rightsholder's name], from [Work's title, author, volume, edition number and year of copyright]; permission conveyed through Copyright Clearance Center, Inc. " Such notice must be provided in a reasonably legible font size and must be placed either immediately adjacent to the Work as used (for example, as part of a by-line or footnote but not as a separate electronic link) or in the place where substantially all other credits or notices for the new work containing the republished Work are located. Failure to include the required notice results in loss to the Rightsholder and CCC, and the User shall be liable to pay liquidated damages for each such failure equal to twice the use fee specified in the Order Confirmation, in addition to the use fee itself and any other fees and charges specified.
- 3.6. User may only make alterations to the Work if and as expressly set forth in the Order Confirmation. No Work may be used in any way that is defamatory, violates the rights of third parties (including such third parties' rights of copyright, privacy, publicity, or other tangible or intangible property), or is otherwise illegal, sexually explicit or obscene. In addition, User may not conjoin a Work with any other material that may result in damage to the reputation of the Rightsholder. User agrees to inform CCC if it becomes aware of any infringement of any rights in a Work and to cooperate with any reasonable request of CCC or the Rightsholder in connection therewith.
4. Indemnity. User hereby indemnifies and agrees to defend the Rightsholder and CCC, and their respective employees and directors, against all claims, liability, damages, costs and expenses, including legal fees and expenses, arising out of any use of a Work beyond the scope of the rights granted herein, or any use of a Work which has been altered in any unauthorized way by User, including claims of defamation or infringement of rights of copyright, publicity, privacy or other tangible or intangible property.
5. Limitation of Liability. UNDER NO CIRCUMSTANCES WILL CCC OR THE RIGHTSHOLDER BE LIABLE FOR ANY DIRECT, INDIRECT, CONSEQUENTIAL OR INCIDENTAL DAMAGES (INCLUDING WITHOUT LIMITATION DAMAGES FOR LOSS OF BUSINESS PROFITS OR INFORMATION, OR FOR BUSINESS INTERRUPTION) ARISING OUT OF THE USE OR INABILITY TO USE A WORK, EVEN IF ONE OF THEM HAS BEEN ADVISED OF THE POSSIBILITY OF SUCH DAMAGES. In any event, the total liability of the Rightsholder and CCC (including their respective employees and directors) shall not exceed the total amount actually paid by User for this license. User assumes full liability for the actions and omissions of its principals, employees, agents, affiliates, successors and assigns.
6. Limited Warranties. THE WORK(S) AND RIGHT(S) ARE PROVIDED "AS IS". CCC HAS THE RIGHT TO GRANT TO USER THE RIGHTS GRANTED IN THE ORDER CONFIRMATION DOCUMENT. CCC AND THE RIGHTSHOLDER DISCLAIM ALL OTHER WARRANTIES RELATING TO THE WORK(S) AND RIGHT(S), EITHER EXPRESS OR IMPLIED, INCLUDING WITHOUT LIMITATION IMPLIED WARRANTIES OF MERCHANTABILITY OR FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE. ADDITIONAL RIGHTS MAY BE REQUIRED TO USE ILLUSTRATIONS, GRAPHS, PHOTOGRAPHS, ABSTRACTS, INSERTS OR OTHER PORTIONS OF THE WORK (AS OPPOSED TO THE ENTIRE WORK) IN A MANNER CONTEMPLATED BY USER; USER UNDERSTANDS AND AGREES THAT NEITHER CCC NOR THE RIGHTSHOLDER MAY HAVE SUCH ADDITIONAL RIGHTS TO GRANT.
7. Effect of Breach. Any failure by User to pay any amount when due, or any use by User of a Work beyond the scope of the license set forth in the Order Confirmation and/or these terms and conditions, shall be a material breach of the license created by the Order Confirmation and these terms and conditions. Any breach not cured within 30 days of written notice thereof shall result in immediate termination of such license without further notice. Any unauthorized (but licensable) use of a Work that is terminated immediately upon notice thereof may be liquidated by payment of the Rightsholder's ordinary license price therefor; any unauthorized (and unlicensable) use that is not terminated immediately for any reason (including, for example, because materials containing the Work cannot reasonably be recalled) will be subject to all remedies available at law or in equity, but in no event to a payment of

less than three times the Rightsholder's ordinary license price for the most closely analogous licensable use plus Rightsholder's and/or CCC's costs and expenses incurred in collecting such payment.

#### 8. Miscellaneous.

- 8.1. User acknowledges that CCC may, from time to time, make changes or additions to the Service or to these terms and conditions, and CCC reserves the right to send notice to the User by electronic mail or otherwise for the purposes of notifying User of such changes or additions; provided that any such changes or additions shall not apply to permissions already secured and paid for.
- 8.2. Use of User-related information collected through the Service is governed by CCC's privacy policy, available online here:<https://marketplace.copyright.com/rs-ui-web/mp/privacy-policy>
- 8.3. The licensing transaction described in the Order Confirmation is personal to User. Therefore, User may not assign or transfer to any other person (whether a natural person or an organization of any kind) the license created by the Order Confirmation and these terms and conditions or any rights granted hereunder; provided, however, that User may assign such license in its entirety on written notice to CCC in the event of a transfer of all or substantially all of User's rights in the new material which includes the Work(s) licensed under this Service.
- 8.4. No amendment or waiver of any terms is binding unless set forth in writing and signed by the parties. The Rightsholder and CCC hereby object to any terms contained in any writing prepared by the User or its principals, employees, agents or affiliates and purporting to govern or otherwise relate to the licensing transaction described in the Order Confirmation, which terms are in any way inconsistent with any terms set forth in the Order Confirmation and/or in these terms and conditions or CCC's standard operating procedures, whether such writing is prepared prior to, simultaneously with or subsequent to the Order Confirmation, and whether such writing appears on a copy of the Order Confirmation or in a separate instrument.
- 8.5. The licensing transaction described in the Order Confirmation document shall be governed by and construed under the law of the State of New York, USA, without regard to the principles thereof of conflicts of law. Any case, controversy, suit, action, or proceeding arising out of, in connection with, or related to such licensing transaction shall be brought, at CCC's sole discretion, in any federal or state court located in the County of New York, State of New York, USA, or in any federal or state court whose geographical jurisdiction covers the location of the Rightsholder set forth in the Order Confirmation. The parties expressly submit to the personal jurisdiction and venue of each such federal or state court. If you have any comments or questions about the Service or Copyright Clearance Center, please contact us at 978-750-8400 or send an e-mail to [support@copyright.com](mailto:support@copyright.com).

## JOHN WILEY AND SONS LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Sep 29, 2021

---

---

This Agreement between Fraciele Flores Vit ("You") and John Wiley and Sons ("John Wiley and Sons") consists of your license details and the terms and conditions provided by John Wiley and Sons and Copyright Clearance Center.

License Number 5158020713102

License date Sep 29, 2021

Licensed Content  
Publisher John Wiley and Sons

Licensed Content  
Publication Biotechnology Progress

Licensed Content  
Title Microfluidic tools toward industrial biotechnology

Licensed Content  
Author Lucimara G. de la Torre, Reinaldo G. Bastos, Amanda C. S. N. Pessoa,  
et al

Licensed Content  
Date Sep 21, 2016

Licensed Content  
Volume 32

Licensed Content  
Issue 6

Licensed Content  
Pages 18

Type of use Dissertation/Thesis

Requestor type University/Academic

|                            |                                                                                                                       |
|----------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Format                     | Print and electronic                                                                                                  |
| Portion                    | Figure/table                                                                                                          |
| Number of figures/tables   | 1                                                                                                                     |
| Will you be translating?   | No                                                                                                                    |
| Title                      | Microfluidic microdevice to study the behavior cells in the presence of different concentrations of drugs             |
| Institution name           | University of Campinas                                                                                                |
| Expected presentation date | Dec 2021                                                                                                              |
| Order reference number     | Figure 2                                                                                                              |
| Portions                   | Figure 2                                                                                                              |
| Requestor Location         | Fraciele Flores Vit<br>Av Anchieta 369-Centro<br>Campinas, São Paulo 13015-101<br>Brazil<br>Attn: Fraciele Flores Vit |
| Publisher Tax ID           | EU826007151                                                                                                           |
| Total                      | 0.00 USD                                                                                                              |

#### Terms and Conditions

### TERMS AND CONDITIONS

This copyrighted material is owned by or exclusively licensed to John Wiley & Sons, Inc. or one of its group companies (each a "Wiley Company") or handled on behalf of a society with which a Wiley Company has exclusive publishing rights in relation to a particular work (collectively "WILEY"). By clicking "accept" in connection with completing this licensing

transaction, you agree that the following terms and conditions apply to this transaction (along with the billing and payment terms and conditions established by the Copyright Clearance Center Inc., ("CCC's Billing and Payment terms and conditions"), at the time that you opened your RightsLink account (these are available at any time at <http://myaccount.copyright.com>).

## Terms and Conditions

- The materials you have requested permission to reproduce or reuse (the "Wiley Materials") are protected by copyright.
- You are hereby granted a personal, non-exclusive, non-sub licensable (on a stand-alone basis), non-transferable, worldwide, limited license to reproduce the Wiley Materials for the purpose specified in the licensing process. This license, **and any CONTENT (PDF or image file) purchased as part of your order**, is for a one-time use only and limited to any maximum distribution number specified in the license. The first instance of republication or reuse granted by this license must be completed within two years of the date of the grant of this license (although copies prepared before the end date may be distributed thereafter). The Wiley Materials shall not be used in any other manner or for any other purpose, beyond what is granted in the license. Permission is granted subject to an appropriate acknowledgement given to the author, title of the material/book/journal and the publisher. You shall also duplicate the copyright notice that appears in the Wiley publication in your use of the Wiley Material. Permission is also granted on the understanding that nowhere in the text is a previously published source acknowledged for all or part of this Wiley Material. Any third party content is expressly excluded from this permission.
- With respect to the Wiley Materials, all rights are reserved. Except as expressly granted by the terms of the license, no part of the Wiley Materials may be copied, modified, adapted (except for minor reformatting required by the new Publication), translated, reproduced, transferred or distributed, in any form or by any means, and no derivative works may be made based on the Wiley Materials without the prior permission of the respective copyright owner.**For STM Signatory Publishers clearing permission under the terms of the [STM Permissions Guidelines](#) only, the terms of the license are extended to include subsequent editions and for editions in other languages, provided such editions are for the work as a whole in situ and does not involve the separate exploitation of the permitted figures or extracts,** You may not alter, remove or suppress in any manner any copyright, trademark or other notices displayed by the Wiley Materials. You may not license, rent, sell, loan, lease, pledge, offer as security, transfer or assign the Wiley Materials on a stand-alone basis, or any of the rights granted to you hereunder to any other person.
- The Wiley Materials and all of the intellectual property rights therein shall at all times remain the exclusive property of John Wiley & Sons Inc, the Wiley Companies, or their respective licensors, and your interest therein is only that of having possession of and the right to reproduce the Wiley Materials pursuant to Section 2 herein during the continuance of this Agreement. You agree that you own no right, title or interest in or to the Wiley Materials or any of the intellectual property rights therein. You shall have no rights hereunder other than the license as provided for above in Section 2. No right, license or interest to any trademark, trade name, service mark or other branding ("Marks") of WILEY or its licensors is granted hereunder, and you agree that you shall not assert any such right, license or interest with respect thereto
- NEITHER WILEY NOR ITS LICENSORS MAKES ANY WARRANTY OR REPRESENTATION OF ANY KIND TO YOU OR ANY THIRD PARTY, EXPRESS, IMPLIED OR STATUTORY, WITH RESPECT TO THE MATERIALS OR THE ACCURACY OF ANY INFORMATION CONTAINED IN THE

MATERIALS, INCLUDING, WITHOUT LIMITATION, ANY IMPLIED WARRANTY OF MERCHANTABILITY, ACCURACY, SATISFACTORY QUALITY, FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE, USABILITY, INTEGRATION OR NON-INFRINGEMENT AND ALL SUCH WARRANTIES ARE HEREBY EXCLUDED BY WILEY AND ITS LICENSORS AND WAIVED BY YOU.

- WILEY shall have the right to terminate this Agreement immediately upon breach of this Agreement by you.
- You shall indemnify, defend and hold harmless WILEY, its Licensors and their respective directors, officers, agents and employees, from and against any actual or threatened claims, demands, causes of action or proceedings arising from any breach of this Agreement by you.
- IN NO EVENT SHALL WILEY OR ITS LICENSORS BE LIABLE TO YOU OR ANY OTHER PARTY OR ANY OTHER PERSON OR ENTITY FOR ANY SPECIAL, CONSEQUENTIAL, INCIDENTAL, INDIRECT, EXEMPLARY OR PUNITIVE DAMAGES, HOWEVER CAUSED, ARISING OUT OF OR IN CONNECTION WITH THE DOWNLOADING, PROVISIONING, VIEWING OR USE OF THE MATERIALS REGARDLESS OF THE FORM OF ACTION, WHETHER FOR BREACH OF CONTRACT, BREACH OF WARRANTY, TORT, NEGLIGENCE, INFRINGEMENT OR OTHERWISE (INCLUDING, WITHOUT LIMITATION, DAMAGES BASED ON LOSS OF PROFITS, DATA, FILES, USE, BUSINESS OPPORTUNITY OR CLAIMS OF THIRD PARTIES), AND WHETHER OR NOT THE PARTY HAS BEEN ADVISED OF THE POSSIBILITY OF SUCH DAMAGES. THIS LIMITATION SHALL APPLY NOTWITHSTANDING ANY FAILURE OF ESSENTIAL PURPOSE OF ANY LIMITED REMEDY PROVIDED HEREIN.
- Should any provision of this Agreement be held by a court of competent jurisdiction to be illegal, invalid, or unenforceable, that provision shall be deemed amended to achieve as nearly as possible the same economic effect as the original provision, and the legality, validity and enforceability of the remaining provisions of this Agreement shall not be affected or impaired thereby.
- The failure of either party to enforce any term or condition of this Agreement shall not constitute a waiver of either party's right to enforce each and every term and condition of this Agreement. No breach under this agreement shall be deemed waived or excused by either party unless such waiver or consent is in writing signed by the party granting such waiver or consent. The waiver by or consent of a party to a breach of any provision of this Agreement shall not operate or be construed as a waiver of or consent to any other or subsequent breach by such other party.
- This Agreement may not be assigned (including by operation of law or otherwise) by you without WILEY's prior written consent.
- Any fee required for this permission shall be non-refundable after thirty (30) days from receipt by the CCC.
- These terms and conditions together with CCC's Billing and Payment terms and conditions (which are incorporated herein) form the entire agreement between you and WILEY concerning this licensing transaction and (in the absence of fraud) supersedes all prior agreements and representations of the parties, oral or written. This Agreement may not be amended except in writing signed by both parties. This Agreement shall be binding upon and inure to the benefit of the parties' successors, legal representatives, and authorized assigns.

- In the event of any conflict between your obligations established by these terms and conditions and those established by CCC's Billing and Payment terms and conditions, these terms and conditions shall prevail.
- WILEY expressly reserves all rights not specifically granted in the combination of (i) the license details provided by you and accepted in the course of this licensing transaction, (ii) these terms and conditions and (iii) CCC's Billing and Payment terms and conditions.
- This Agreement will be void if the Type of Use, Format, Circulation, or Requestor Type was misrepresented during the licensing process.
- This Agreement shall be governed by and construed in accordance with the laws of the State of New York, USA, without regards to such state's conflict of law rules. Any legal action, suit or proceeding arising out of or relating to these Terms and Conditions or the breach thereof shall be instituted in a court of competent jurisdiction in New York County in the State of New York in the United States of America and each party hereby consents and submits to the personal jurisdiction of such court, waives any objection to venue in such court and consents to service of process by registered or certified mail, return receipt requested, at the last known address of such party.

## WILEY OPEN ACCESS TERMS AND CONDITIONS

Wiley Publishes Open Access Articles in fully Open Access Journals and in Subscription journals offering Online Open. Although most of the fully Open Access journals publish open access articles under the terms of the Creative Commons Attribution (CC BY) License only, the subscription journals and a few of the Open Access Journals offer a choice of Creative Commons Licenses. The license type is clearly identified on the article.

### The Creative Commons Attribution License

The [Creative Commons Attribution License \(CC-BY\)](#) allows users to copy, distribute and transmit an article, adapt the article and make commercial use of the article. The CC-BY license permits commercial and non-

### Creative Commons Attribution Non-Commercial License

The [Creative Commons Attribution Non-Commercial \(CC-BY-NC\) License](#) permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited and is not used for commercial purposes.(see below)

### Creative Commons Attribution-Non-Commercial-NoDerivs License

The [Creative Commons Attribution Non-Commercial-NoDerivs License](#) (CC-BY-NC-ND) permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited, is not used for commercial purposes and no modifications or adaptations are made. (see below)

### Use by commercial "for-profit" organizations

Use of Wiley Open Access articles for commercial, promotional, or marketing purposes requires further explicit permission from Wiley and will be subject to a fee.

Further details can be found on Wiley Online Library  
<http://olabout.wiley.com/WileyCDA/Section/id-410895.html>

## Other Terms and Conditions:

**v1.10 Last updated September 2015**

**Questions? [customercare@copyright.com](mailto:customercare@copyright.com) or +1-855-239-3415 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.**

---

## ELSEVIER LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Sep 29, 2021

---

---

This Agreement between Fraciele Flores Vit ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.

|                              |                                                                                                                     |
|------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| License Number               | 5158020891132                                                                                                       |
| License date                 | Sep 29, 2021                                                                                                        |
| Licensed Content Publisher   | Elsevier                                                                                                            |
| Licensed Content Publication | Biosensors and Bioelectronics                                                                                       |
| Licensed Content Title       | Unidirectional intercellular communication on a microfluidic chip                                                   |
| Licensed Content Author      | Guocheng Fang,Hongxu Lu,Hamidreza Aboulkheyr Es,Dejiang Wang,Yuan Liu,Majid Ebrahimi Warkiani,Gungun Lin,Dayong Jin |
| Licensed Content Date        | Mar 1, 2021                                                                                                         |
| Licensed Content Volume      | 175                                                                                                                 |
| Licensed Content Issue       | n/a                                                                                                                 |
| Licensed Content Pages       | 1                                                                                                                   |
| Start Page                   | 112833                                                                                                              |
| End Page                     | 0                                                                                                                   |
| Type of Use                  | reuse in a thesis/dissertation                                                                                      |

|                                              |                                                                                                                           |
|----------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Portion                                      | figures/tables/illustrations                                                                                              |
| Number of figures/tables/illustrations       | 1                                                                                                                         |
| Format                                       | both print and electronic                                                                                                 |
| Are you the author of this Elsevier article? | No                                                                                                                        |
| Will you be translating?                     | No                                                                                                                        |
| Title                                        | Microfluidic microdevice to study the behavior cells in the presence of different concentrations of drugs                 |
| Institution name                             | University of Campinas                                                                                                    |
| Expected presentation date                   | Dec 2021                                                                                                                  |
| Order reference number                       | Figure 1                                                                                                                  |
| Portions                                     | Figure 1                                                                                                                  |
| Requestor Location                           | Fraciele Flores Vit<br>Av Anchieta 369-Centro<br><br>Campinas, São Paulo 13015-101<br>Brazil<br>Attn: Fraciele Flores Vit |
| Publisher Tax ID                             | GB 494 6272 12                                                                                                            |
| Total                                        | 0.00 USD                                                                                                                  |
| Terms and Conditions                         |                                                                                                                           |

## INTRODUCTION

1. The publisher for this copyrighted material is Elsevier. By clicking "accept" in connection with completing this licensing transaction, you agree that the following terms and conditions apply to this transaction (along with the Billing and Payment terms and conditions

established by Copyright Clearance Center, Inc. ("CCC"), at the time that you opened your Rightslink account and that are available at any time at <http://myaccount.copyright.com>).

## GENERAL TERMS

2. Elsevier hereby grants you permission to reproduce the aforementioned material subject to the terms and conditions indicated.

3. Acknowledgement: If any part of the material to be used (for example, figures) has appeared in our publication with credit or acknowledgement to another source, permission must also be sought from that source. If such permission is not obtained then that material may not be included in your publication/copies. Suitable acknowledgement to the source must be made, either as a footnote or in a reference list at the end of your publication, as follows:

"Reprinted from Publication title, Vol /edition number, Author(s), Title of article / title of chapter, Pages No., Copyright (Year), with permission from Elsevier [OR APPLICABLE SOCIETY COPYRIGHT OWNER]." Also Lancet special credit - "Reprinted from The Lancet, Vol. number, Author(s), Title of article, Pages No., Copyright (Year), with permission from Elsevier."

4. Reproduction of this material is confined to the purpose and/or media for which permission is hereby given.

5. Altering/Modifying Material: Not Permitted. However figures and illustrations may be altered/adapted minimally to serve your work. Any other abbreviations, additions, deletions and/or any other alterations shall be made only with prior written authorization of Elsevier Ltd. (Please contact Elsevier's permissions helpdesk [here](#)). No modifications can be made to any Lancet figures/tables and they must be reproduced in full.

6. If the permission fee for the requested use of our material is waived in this instance, please be advised that your future requests for Elsevier materials may attract a fee.

7. Reservation of Rights: Publisher reserves all rights not specifically granted in the combination of (i) the license details provided by you and accepted in the course of this licensing transaction, (ii) these terms and conditions and (iii) CCC's Billing and Payment terms and conditions.

8. License Contingent Upon Payment: While you may exercise the rights licensed immediately upon issuance of the license at the end of the licensing process for the transaction, provided that you have disclosed complete and accurate details of your proposed use, no license is finally effective unless and until full payment is received from you (either by publisher or by CCC) as provided in CCC's Billing and Payment terms and conditions. If full payment is not received on a timely basis, then any license preliminarily granted shall be deemed automatically revoked and shall be void as if never granted. Further, in the event that you breach any of these terms and conditions or any of CCC's Billing and Payment terms and conditions, the license is automatically revoked and shall be void as if never granted. Use of materials as described in a revoked license, as well as any use of the materials beyond the scope of an unrevoked license, may constitute copyright infringement and publisher reserves the right to take any and all action to protect its copyright in the materials.

9. Warranties: Publisher makes no representations or warranties with respect to the licensed material.

10. Indemnity: You hereby indemnify and agree to hold harmless publisher and CCC, and their respective officers, directors, employees and agents, from and against any and all claims arising out of your use of the licensed material other than as specifically authorized pursuant to this license.

11. **No Transfer of License:** This license is personal to you and may not be sublicensed, assigned, or transferred by you to any other person without publisher's written permission.

12. **No Amendment Except in Writing:** This license may not be amended except in a writing signed by both parties (or, in the case of publisher, by CCC on publisher's behalf).

13. **Objection to Contrary Terms:** Publisher hereby objects to any terms contained in any purchase order, acknowledgment, check endorsement or other writing prepared by you, which terms are inconsistent with these terms and conditions or CCC's Billing and Payment terms and conditions. These terms and conditions, together with CCC's Billing and Payment terms and conditions (which are incorporated herein), comprise the entire agreement between you and publisher (and CCC) concerning this licensing transaction. In the event of any conflict between your obligations established by these terms and conditions and those established by CCC's Billing and Payment terms and conditions, these terms and conditions shall control.

14. **Revocation:** Elsevier or Copyright Clearance Center may deny the permissions described in this License at their sole discretion, for any reason or no reason, with a full refund payable to you. Notice of such denial will be made using the contact information provided by you. Failure to receive such notice will not alter or invalidate the denial. In no event will Elsevier or Copyright Clearance Center be responsible or liable for any costs, expenses or damage incurred by you as a result of a denial of your permission request, other than a refund of the amount(s) paid by you to Elsevier and/or Copyright Clearance Center for denied permissions.

### LIMITED LICENSE

The following terms and conditions apply only to specific license types:

15. **Translation:** This permission is granted for non-exclusive world **English** rights only unless your license was granted for translation rights. If you licensed translation rights you may only translate this content into the languages you requested. A professional translator must perform all translations and reproduce the content word for word preserving the integrity of the article.

16. **Posting licensed content on any Website:** The following terms and conditions apply as follows: Licensing material from an Elsevier journal: All content posted to the web site must maintain the copyright information line on the bottom of each image; A hyper-text must be included to the Homepage of the journal from which you are licensing at <http://www.sciencedirect.com/science/journal/xxxxx> or the Elsevier homepage for books at <http://www.elsevier.com>; Central Storage: This license does not include permission for a scanned version of the material to be stored in a central repository such as that provided by Heron/XanEdu.

Licensing material from an Elsevier book: A hyper-text link must be included to the Elsevier homepage at <http://www.elsevier.com>. All content posted to the web site must maintain the copyright information line on the bottom of each image.

**Posting licensed content on Electronic reserve:** In addition to the above the following clauses are applicable: The web site must be password-protected and made available only to bona fide students registered on a relevant course. This permission is granted for 1 year only. You may obtain a new license for future website posting.

17. **For journal authors:** the following clauses are applicable in addition to the above:

**Preprints:**

A preprint is an author's own write-up of research results and analysis, it has not been peer-reviewed, nor has it had any other value added to it by a publisher (such as formatting, copyright, technical enhancement etc.).

Authors can share their preprints anywhere at any time. Preprints should not be added to or enhanced in any way in order to appear more like, or to substitute for, the final versions of articles however authors can update their preprints on arXiv or RePEc with their Accepted Author Manuscript (see below).

If accepted for publication, we encourage authors to link from the preprint to their formal publication via its DOI. Millions of researchers have access to the formal publications on ScienceDirect, and so links will help users to find, access, cite and use the best available version. Please note that Cell Press, The Lancet and some society-owned have different preprint policies. Information on these policies is available on the journal homepage.

**Accepted Author Manuscripts:** An accepted author manuscript is the manuscript of an article that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and editor-author communications.

Authors can share their accepted author manuscript:

- immediately
  - via their non-commercial person homepage or blog
  - by updating a preprint in arXiv or RePEc with the accepted manuscript
  - via their research institute or institutional repository for internal institutional uses or as part of an invitation-only research collaboration work-group
  - directly by providing copies to their students or to research collaborators for their personal use
  - for private scholarly sharing as part of an invitation-only work group on commercial sites with which Elsevier has an agreement
- After the embargo period
  - via non-commercial hosting platforms such as their institutional repository
  - via commercial sites with which Elsevier has an agreement

In all cases accepted manuscripts should:

- link to the formal publication via its DOI
- bear a CC-BY-NC-ND license - this is easy to do
- if aggregated with other manuscripts, for example in a repository or other site, be shared in alignment with our hosting policy not be added to or enhanced in any way to appear more like, or to substitute for, the published journal article.

**Published journal article (JPA):** A published journal article (PJA) is the definitive final record of published research that appears or will appear in the journal and embodies all value-adding publishing activities including peer review co-ordination, copy-editing, formatting, (if relevant) pagination and online enrichment.

Policies for sharing publishing journal articles differ for subscription and gold open access articles:

**Subscription Articles:** If you are an author, please share a link to your article rather than the full-text. Millions of researchers have access to the formal publications on ScienceDirect, and so links will help your users to find, access, cite, and use the best available version.

Theses and dissertations which contain embedded PJAs as part of the formal submission can be posted publicly by the awarding institution with DOI links back to the formal publications on ScienceDirect.

If you are affiliated with a library that subscribes to ScienceDirect you have additional private sharing rights for others' research accessed under that agreement. This includes use for classroom teaching and internal training at the institution (including use in course packs and courseware programs), and inclusion of the article for grant funding purposes.

**Gold Open Access Articles:** May be shared according to the author-selected end-user license and should contain a [CrossMark logo](#), the end user license, and a DOI link to the formal publication on ScienceDirect.

Please refer to Elsevier's [posting.policy](#) for further information.

**18. For book authors** the following clauses are applicable in addition to the above: Authors are permitted to place a brief summary of their work online only. You are not allowed to download and post the published electronic version of your chapter, nor may you scan the printed edition to create an electronic version. **Posting to a repository:** Authors are permitted to post a summary of their chapter only in their institution's repository.

**19. Thesis/Dissertation:** If your license is for use in a thesis/dissertation your thesis may be submitted to your institution in either print or electronic form. Should your thesis be published commercially, please reapply for permission. These requirements include permission for the Library and Archives of Canada to supply single copies, on demand, of the complete thesis and include permission for Proquest/UMI to supply single copies, on demand, of the complete thesis. Should your thesis be published commercially, please reapply for permission. Theses and dissertations which contain embedded PJAs as part of the formal submission can be posted publicly by the awarding institution with DOI links back to the formal publications on ScienceDirect.

## **Elsevier Open Access Terms and Conditions**

You can publish open access with Elsevier in hundreds of open access journals or in nearly 2000 established subscription journals that support open access publishing. Permitted third party re-use of these open access articles is defined by the author's choice of Creative Commons user license. See our [open access license policy](#) for more information.

### **Terms & Conditions applicable to all Open Access articles published with Elsevier:**

Any reuse of the article must not represent the author as endorsing the adaptation of the article nor should the article be modified in such a way as to damage the author's honour or reputation. If any changes have been made, such changes must be clearly indicated.

The author(s) must be appropriately credited and we ask that you include the end user license and a DOI link to the formal publication on ScienceDirect.

If any part of the material to be used (for example, figures) has appeared in our publication with credit or acknowledgement to another source it is the responsibility of the user to ensure their reuse complies with the terms and conditions determined by the rights holder.

### **Additional Terms & Conditions applicable to each Creative Commons user license:**

**CC BY:** The CC-BY license allows users to copy, to create extracts, abstracts and new works from the Article, to alter and revise the Article and to make commercial use of the Article (including reuse and/or resale of the Article by commercial entities), provided the user gives appropriate credit (with a link to the formal publication through the relevant DOI), provides a link to the license, indicates if changes were made and the licensor is not represented as endorsing the use made of the work. The full details of the license are available at <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>.

**CC BY NC SA:** The CC BY-NC-SA license allows users to copy, to create extracts, abstracts and new works from the Article, to alter and revise the Article, provided this is not done for commercial purposes, and that the user gives appropriate credit (with a link to the formal publication through the relevant DOI), provides a link to the license, indicates if changes were made and the licensor is not represented as endorsing the use made of the work. Further, any new works must be made available on the same conditions. The full details of the license are available at <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0>.

**CC BY NC ND:** The CC BY-NC-ND license allows users to copy and distribute the Article, provided this is not done for commercial purposes and further does not permit distribution of the Article if it is changed or edited in any way, and provided the user gives appropriate credit (with a link to the formal publication through the relevant DOI), provides a link to the license, and that the licensor is not represented as endorsing the use made of the work. The full details of the license are available at <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0>. Any commercial reuse of Open Access articles published with a CC BY NC SA or CC BY NC ND license requires permission from Elsevier and will be subject to a fee.

Commercial reuse includes:

- Associating advertising with the full text of the Article
- Charging fees for document delivery or access
- Article aggregation
- Systematic distribution via e-mail lists or share buttons

Posting or linking by commercial companies for use by customers of those companies.

## 20. Other Conditions:

v1.10

Questions? [customercare@copyright.com](mailto:customercare@copyright.com) or +1-855-239-3415 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.

This page is available in the following languages:



# Creative Commons License Deed

---

## Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International (CC BY-NC-ND 4.0)

This is a human-readable summary of (and not a substitute for) the [license](#).

### You are free to:

**Share** — copy and redistribute the material in any medium or format

The licensor cannot revoke these freedoms as long as you follow the license terms.

### Under the following terms:

**Attribution** — You must give appropriate credit, provide a link to the license, and indicate if changes were made. You may do so in any reasonable manner, but not in any way that suggests the licensor endorses you or your use.

**NonCommercial** — You may not use the material for commercial purposes.

**NoDerivatives** — If you remix, transform, or build upon the material, you may not distribute the modified material.

**No additional restrictions** — You may not apply legal terms or technological measures that legally restrict others from doing anything the license permits.

### Notices:

You do not have to comply with the license for elements of the material in the public domain or where your use is permitted by an applicable exception or limitation.

No warranties are given. The license may not give you all of the permissions necessary for your intended use. For example, other rights such as publicity, privacy, or moral rights may limit how you use the material.



Home



Help ▾



Email Support



Fraciele Flores Vit ▾

### Combination Stiffness Gradient with Chemical Stimulation Directs Glioma Cell Migration on a Microfluidic Chip

**Author:** Jinxin Dou, Sifeng Mao, Haifang Li, et al**Publication:** Analytical Chemistry**Publisher:** American Chemical Society**Date:** Jan 1, 2020*Copyright © 2020, American Chemical Society*

#### PERMISSION/LICENSE IS GRANTED FOR YOUR ORDER AT NO CHARGE

This type of permission/license, instead of the standard Terms and Conditions, is sent to you because no fee is being charged for your order. Please note the following:

- Permission is granted for your request in both print and electronic formats, and translations.
- If figures and/or tables were requested, they may be adapted or used in part.
- Please print this page for your records and send a copy of it to your publisher/graduate school.
- Appropriate credit for the requested material should be given as follows: "Reprinted (adapted) with permission from {COMPLETE REFERENCE CITATION}. Copyright {YEAR} American Chemical Society." Insert appropriate information in place of the capitalized words.
- One-time permission is granted only for the use specified in your RightsLink request. No additional uses are granted (such as derivative works or other editions). For any uses, please submit a new request.

If credit is given to another source for the material you requested from RightsLink, permission must be obtained from that source.

[BACK](#)[CLOSE WINDOW](#)

## JOHN WILEY AND SONS LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Sep 29, 2021

---

---

This Agreement between Fraciele Flores Vit ("You") and John Wiley and Sons ("John Wiley and Sons") consists of your license details and the terms and conditions provided by John Wiley and Sons and Copyright Clearance Center.

License Number 5158030180123

License date Sep 29, 2021

Licensed Content  
Publisher John Wiley and Sons

Licensed Content  
Publication Biotechnology & Bioengineering

Licensed Content  
Title Continuous perfusion microfluidic cell culture array for high-throughput cell-based assays

Licensed Content  
Author Luke P. Lee, Robert Lin, Poorya Sabounchi, et al

Licensed Content  
Date Dec 3, 2004

Licensed Content  
Volume 89

Licensed Content  
Issue 1

Licensed Content  
Pages 8

Type of use Dissertation/Thesis

Requestor type University/Academic

|                            |                                                                                                                       |
|----------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Format                     | Print and electronic                                                                                                  |
| Portion                    | Figure/table                                                                                                          |
| Number of figures/tables   | 1                                                                                                                     |
| Will you be translating?   | No                                                                                                                    |
| Title                      | Microfluidic microdevice to study the behavior cells in the presence of different concentrations of drugs             |
| Institution name           | University of Campinas                                                                                                |
| Expected presentation date | Dec 2021                                                                                                              |
| Order reference number     | Figure 1                                                                                                              |
| Portions                   | Figure 1                                                                                                              |
| Requestor Location         | Fraciele Flores Vit<br>Av Anchieta 369-Centro<br>Campinas, São Paulo 13015-101<br>Brazil<br>Attn: Fraciele Flores Vit |
| Publisher Tax ID           | EU826007151                                                                                                           |
| Total                      | 0.00 USD                                                                                                              |

#### Terms and Conditions

### TERMS AND CONDITIONS

This copyrighted material is owned by or exclusively licensed to John Wiley & Sons, Inc. or one of its group companies (each a "Wiley Company") or handled on behalf of a society with which a Wiley Company has exclusive publishing rights in relation to a particular work (collectively "WILEY"). By clicking "accept" in connection with completing this licensing

transaction, you agree that the following terms and conditions apply to this transaction (along with the billing and payment terms and conditions established by the Copyright Clearance Center Inc., ("CCC's Billing and Payment terms and conditions"), at the time that you opened your RightsLink account (these are available at any time at <http://myaccount.copyright.com>).

## Terms and Conditions

- The materials you have requested permission to reproduce or reuse (the "Wiley Materials") are protected by copyright.
- You are hereby granted a personal, non-exclusive, non-sub licensable (on a stand-alone basis), non-transferable, worldwide, limited license to reproduce the Wiley Materials for the purpose specified in the licensing process. This license, **and any CONTENT (PDF or image file) purchased as part of your order**, is for a one-time use only and limited to any maximum distribution number specified in the license. The first instance of republication or reuse granted by this license must be completed within two years of the date of the grant of this license (although copies prepared before the end date may be distributed thereafter). The Wiley Materials shall not be used in any other manner or for any other purpose, beyond what is granted in the license. Permission is granted subject to an appropriate acknowledgement given to the author, title of the material/book/journal and the publisher. You shall also duplicate the copyright notice that appears in the Wiley publication in your use of the Wiley Material. Permission is also granted on the understanding that nowhere in the text is a previously published source acknowledged for all or part of this Wiley Material. Any third party content is expressly excluded from this permission.
- With respect to the Wiley Materials, all rights are reserved. Except as expressly granted by the terms of the license, no part of the Wiley Materials may be copied, modified, adapted (except for minor reformatting required by the new Publication), translated, reproduced, transferred or distributed, in any form or by any means, and no derivative works may be made based on the Wiley Materials without the prior permission of the respective copyright owner.**For STM Signatory Publishers clearing permission under the terms of the [STM Permissions Guidelines](#) only, the terms of the license are extended to include subsequent editions and for editions in other languages, provided such editions are for the work as a whole in situ and does not involve the separate exploitation of the permitted figures or extracts,** You may not alter, remove or suppress in any manner any copyright, trademark or other notices displayed by the Wiley Materials. You may not license, rent, sell, loan, lease, pledge, offer as security, transfer or assign the Wiley Materials on a stand-alone basis, or any of the rights granted to you hereunder to any other person.
- The Wiley Materials and all of the intellectual property rights therein shall at all times remain the exclusive property of John Wiley & Sons Inc, the Wiley Companies, or their respective licensors, and your interest therein is only that of having possession of and the right to reproduce the Wiley Materials pursuant to Section 2 herein during the continuance of this Agreement. You agree that you own no right, title or interest in or to the Wiley Materials or any of the intellectual property rights therein. You shall have no rights hereunder other than the license as provided for above in Section 2. No right, license or interest to any trademark, trade name, service mark or other branding ("Marks") of WILEY or its licensors is granted hereunder, and you agree that you shall not assert any such right, license or interest with respect thereto
- NEITHER WILEY NOR ITS LICENSORS MAKES ANY WARRANTY OR REPRESENTATION OF ANY KIND TO YOU OR ANY THIRD PARTY, EXPRESS, IMPLIED OR STATUTORY, WITH RESPECT TO THE MATERIALS OR THE ACCURACY OF ANY INFORMATION CONTAINED IN THE

MATERIALS, INCLUDING, WITHOUT LIMITATION, ANY IMPLIED WARRANTY OF MERCHANTABILITY, ACCURACY, SATISFACTORY QUALITY, FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE, USABILITY, INTEGRATION OR NON-INFRINGEMENT AND ALL SUCH WARRANTIES ARE HEREBY EXCLUDED BY WILEY AND ITS LICENSORS AND WAIVED BY YOU.

- WILEY shall have the right to terminate this Agreement immediately upon breach of this Agreement by you.
- You shall indemnify, defend and hold harmless WILEY, its Licensors and their respective directors, officers, agents and employees, from and against any actual or threatened claims, demands, causes of action or proceedings arising from any breach of this Agreement by you.
- IN NO EVENT SHALL WILEY OR ITS LICENSORS BE LIABLE TO YOU OR ANY OTHER PARTY OR ANY OTHER PERSON OR ENTITY FOR ANY SPECIAL, CONSEQUENTIAL, INCIDENTAL, INDIRECT, EXEMPLARY OR PUNITIVE DAMAGES, HOWEVER CAUSED, ARISING OUT OF OR IN CONNECTION WITH THE DOWNLOADING, PROVISIONING, VIEWING OR USE OF THE MATERIALS REGARDLESS OF THE FORM OF ACTION, WHETHER FOR BREACH OF CONTRACT, BREACH OF WARRANTY, TORT, NEGLIGENCE, INFRINGEMENT OR OTHERWISE (INCLUDING, WITHOUT LIMITATION, DAMAGES BASED ON LOSS OF PROFITS, DATA, FILES, USE, BUSINESS OPPORTUNITY OR CLAIMS OF THIRD PARTIES), AND WHETHER OR NOT THE PARTY HAS BEEN ADVISED OF THE POSSIBILITY OF SUCH DAMAGES. THIS LIMITATION SHALL APPLY NOTWITHSTANDING ANY FAILURE OF ESSENTIAL PURPOSE OF ANY LIMITED REMEDY PROVIDED HEREIN.
- Should any provision of this Agreement be held by a court of competent jurisdiction to be illegal, invalid, or unenforceable, that provision shall be deemed amended to achieve as nearly as possible the same economic effect as the original provision, and the legality, validity and enforceability of the remaining provisions of this Agreement shall not be affected or impaired thereby.
- The failure of either party to enforce any term or condition of this Agreement shall not constitute a waiver of either party's right to enforce each and every term and condition of this Agreement. No breach under this agreement shall be deemed waived or excused by either party unless such waiver or consent is in writing signed by the party granting such waiver or consent. The waiver by or consent of a party to a breach of any provision of this Agreement shall not operate or be construed as a waiver of or consent to any other or subsequent breach by such other party.
- This Agreement may not be assigned (including by operation of law or otherwise) by you without WILEY's prior written consent.
- Any fee required for this permission shall be non-refundable after thirty (30) days from receipt by the CCC.
- These terms and conditions together with CCC's Billing and Payment terms and conditions (which are incorporated herein) form the entire agreement between you and WILEY concerning this licensing transaction and (in the absence of fraud) supersedes all prior agreements and representations of the parties, oral or written. This Agreement may not be amended except in writing signed by both parties. This Agreement shall be binding upon and inure to the benefit of the parties' successors, legal representatives, and authorized assigns.

- In the event of any conflict between your obligations established by these terms and conditions and those established by CCC's Billing and Payment terms and conditions, these terms and conditions shall prevail.
- WILEY expressly reserves all rights not specifically granted in the combination of (i) the license details provided by you and accepted in the course of this licensing transaction, (ii) these terms and conditions and (iii) CCC's Billing and Payment terms and conditions.
- This Agreement will be void if the Type of Use, Format, Circulation, or Requestor Type was misrepresented during the licensing process.
- This Agreement shall be governed by and construed in accordance with the laws of the State of New York, USA, without regards to such state's conflict of law rules. Any legal action, suit or proceeding arising out of or relating to these Terms and Conditions or the breach thereof shall be instituted in a court of competent jurisdiction in New York County in the State of New York in the United States of America and each party hereby consents and submits to the personal jurisdiction of such court, waives any objection to venue in such court and consents to service of process by registered or certified mail, return receipt requested, at the last known address of such party.

## WILEY OPEN ACCESS TERMS AND CONDITIONS

Wiley Publishes Open Access Articles in fully Open Access Journals and in Subscription journals offering Online Open. Although most of the fully Open Access journals publish open access articles under the terms of the Creative Commons Attribution (CC BY) License only, the subscription journals and a few of the Open Access Journals offer a choice of Creative Commons Licenses. The license type is clearly identified on the article.

### The Creative Commons Attribution License

The [Creative Commons Attribution License \(CC-BY\)](#) allows users to copy, distribute and transmit an article, adapt the article and make commercial use of the article. The CC-BY license permits commercial and non-

### Creative Commons Attribution Non-Commercial License

The [Creative Commons Attribution Non-Commercial \(CC-BY-NC\) License](#) permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited and is not used for commercial purposes.(see below)

### Creative Commons Attribution-Non-Commercial-NoDerivs License

The [Creative Commons Attribution Non-Commercial-NoDerivs License](#) (CC-BY-NC-ND) permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited, is not used for commercial purposes and no modifications or adaptations are made. (see below)

### Use by commercial "for-profit" organizations

Use of Wiley Open Access articles for commercial, promotional, or marketing purposes requires further explicit permission from Wiley and will be subject to a fee.

Further details can be found on Wiley Online Library  
<http://olabout.wiley.com/WileyCDA/Section/id-410895.html>

## Other Terms and Conditions:

**v1.10 Last updated September 2015**

**Questions? [customercare@copyright.com](mailto:customercare@copyright.com) or +1-855-239-3415 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.**

---

## SPRINGER NATURE LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Sep 29, 2021

---

---

This Agreement between Fraciele Flores Vit ("You") and Springer Nature ("Springer Nature") consists of your license details and the terms and conditions provided by Springer Nature and Copyright Clearance Center.

|                                        |                                                                   |
|----------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|
| License Number                         | 5158031270825                                                     |
| License date                           | Sep 29, 2021                                                      |
| Licensed Content Publisher             | Springer Nature                                                   |
| Licensed Content Publication           | Microfluids and Nanofluids                                        |
| Licensed Content Title                 | An on-chip cell culturing and combinatorial drug screening system |
| Licensed Content Author                | Jiahui Sun et al                                                  |
| Licensed Content Date                  | Jul 6, 2017                                                       |
| Type of Use                            | Thesis/Dissertation                                               |
| Requestor type                         | academic/university or research institute                         |
| Format                                 | print and electronic                                              |
| Portion                                | figures/tables/illustrations                                      |
| Number of figures/tables/illustrations | 1                                                                 |
| Will you be translating?               | no                                                                |

Circulation/distribution 200 - 499

Author of this Springer  
Nature content no

Title Microfluidic microdevice to study the behavior cells in the  
presence of different concentrations of drugs

Institution name University of Campinas

Expected presentation  
date Dec 2021

Order reference number Figure 1

Portions Figure 1

Fraciele Flores Vit  
Av Anchieta 369-Centro

Requestor Location  
Campinas, São Paulo 13015-101  
Brazil  
Attn: Fraciele Flores Vit

Total 0.00 USD

Terms and Conditions

### **Springer Nature Customer Service Centre GmbH Terms and Conditions**

This agreement sets out the terms and conditions of the licence (the **Licence**) between you and **Springer Nature Customer Service Centre GmbH** (the **Licensor**). By clicking 'accept' and completing the transaction for the material (**Licensed Material**), you also confirm your acceptance of these terms and conditions.

#### **1. Grant of License**

**1. 1.** The Licensor grants you a personal, non-exclusive, non-transferable, world-wide licence to reproduce the Licensed Material for the purpose specified in your order only. Licences are granted for the specific use requested in the order and for no other use, subject to the conditions below.

**1. 2.** The Licensor warrants that it has, to the best of its knowledge, the rights to license reuse of the Licensed Material. However, you should ensure that the material you are requesting is original to the Licensor and does not carry the copyright of

another entity (as credited in the published version).

**1. 3.** If the credit line on any part of the material you have requested indicates that it was reprinted or adapted with permission from another source, then you should also seek permission from that source to reuse the material.

## 2. Scope of Licence

**2. 1.** You may only use the Licensed Content in the manner and to the extent permitted by these Ts&Cs and any applicable laws.

**2. 2.** A separate licence may be required for any additional use of the Licensed Material, e.g. where a licence has been purchased for print only use, separate permission must be obtained for electronic re-use. Similarly, a licence is only valid in the language selected and does not apply for editions in other languages unless additional translation rights have been granted separately in the licence. Any content owned by third parties are expressly excluded from the licence.

**2. 3.** Similarly, rights for additional components such as custom editions and derivatives require additional permission and may be subject to an additional fee.

Please apply to

[Journalpermissions@springernature.com](mailto:Journalpermissions@springernature.com)/[bookpermissions@springernature.com](mailto:bookpermissions@springernature.com) for these rights.

**2. 4.** Where permission has been granted **free of charge** for material in print, permission may also be granted for any electronic version of that work, provided that the material is incidental to your work as a whole and that the electronic version is essentially equivalent to, or substitutes for, the print version.

**2. 5.** An alternative scope of licence may apply to signatories of the [STM Permissions Guidelines](#), as amended from time to time.

## 3. Duration of Licence

**3. 1.** A licence for is valid from the date of purchase ('Licence Date') at the end of the relevant period in the below table:

| Scope of Licence   | Duration of Licence                               |
|--------------------|---------------------------------------------------|
| Post on a website  | 12 months                                         |
| Presentations      | 12 months                                         |
| Books and journals | Lifetime of the edition in the language purchased |

## 4. Acknowledgement

**4. 1.** The Licensor's permission must be acknowledged next to the Licenced Material in print. In electronic form, this acknowledgement must be visible at the same time as the figures/tables/illustrations or abstract, and must be hyperlinked to the journal/book's homepage. Our required acknowledgement format is in the Appendix below.

## 5. Restrictions on use

**5. 1.** Use of the Licensed Material may be permitted for incidental promotional use and minor editing privileges e.g. minor adaptations of single figures, changes of format, colour and/or style where the adaptation is credited as set out in Appendix 1 below. Any other changes including but not limited to, cropping, adapting, omitting material that affect the meaning, intention or moral rights of the author are strictly prohibited.

**5. 2.** You must not use any Licensed Material as part of any design or trademark.

**5. 3.** Licensed Material may be used in Open Access Publications (OAP) before publication by Springer Nature, but any Licensed Material must be removed from OAP sites prior to final publication.

## 6. Ownership of Rights

**6. 1.** Licensed Material remains the property of either Licensor or the relevant third party and any rights not explicitly granted herein are expressly reserved.

## 7. Warranty

IN NO EVENT SHALL LICENSOR BE LIABLE TO YOU OR ANY OTHER PARTY OR ANY OTHER PERSON OR FOR ANY SPECIAL, CONSEQUENTIAL, INCIDENTAL OR INDIRECT DAMAGES, HOWEVER CAUSED, ARISING OUT OF OR IN CONNECTION WITH THE DOWNLOADING, VIEWING OR USE OF THE MATERIALS REGARDLESS OF THE FORM OF ACTION, WHETHER FOR BREACH OF CONTRACT, BREACH OF WARRANTY, TORT, NEGLIGENCE, INFRINGEMENT OR OTHERWISE (INCLUDING, WITHOUT LIMITATION, DAMAGES BASED ON LOSS OF PROFITS, DATA, FILES, USE, BUSINESS OPPORTUNITY OR CLAIMS OF THIRD PARTIES), AND WHETHER OR NOT THE PARTY HAS BEEN ADVISED OF THE POSSIBILITY OF SUCH DAMAGES. THIS LIMITATION SHALL APPLY NOTWITHSTANDING ANY FAILURE OF ESSENTIAL PURPOSE OF ANY LIMITED REMEDY PROVIDED HEREIN.

## 8. Limitations

**8. 1. BOOKS ONLY:** Where 'reuse in a dissertation/thesis' has been selected the following terms apply: Print rights of the final author's accepted manuscript (for clarity, NOT the published version) for up to 100 copies, electronic rights for use only on a personal website or institutional repository as defined by the Sherpa guideline ([www.sherpa.ac.uk/romeo/](http://www.sherpa.ac.uk/romeo/)).

**8. 2.** For content reuse requests that qualify for permission under the [STM Permissions Guidelines](#), which may be updated from time to time, the STM Permissions Guidelines supersede the terms and conditions contained in this licence.

## 9. Termination and Cancellation

**9. 1.** Licences will expire after the period shown in Clause 3 (above).

**9. 2.** Licensee reserves the right to terminate the Licence in the event that payment is not received in full or if there has been a breach of this agreement by you.

## **Appendix 1 — Acknowledgements:**

### **For Journal Content:**

Reprinted by permission from [the Licensors]: [Journal Publisher (e.g. Nature/Springer/Palgrave)] [JOURNAL NAME] [REFERENCE CITATION (Article name, Author(s) Name), [COPYRIGHT] (year of publication)]

### **For Advance Online Publication papers:**

Reprinted by permission from [the Licensors]: [Journal Publisher (e.g. Nature/Springer/Palgrave)] [JOURNAL NAME] [REFERENCE CITATION (Article name, Author(s) Name), [COPYRIGHT] (year of publication), advance online publication, day month year (doi: 10.1038/sj.[JOURNAL ACRONYM].)]

### **For Adaptations/Translations:**

Adapted/Translated by permission from [the Licensors]: [Journal Publisher (e.g. Nature/Springer/Palgrave)] [JOURNAL NAME] [REFERENCE CITATION (Article name, Author(s) Name), [COPYRIGHT] (year of publication)]

### **Note: For any republication from the British Journal of Cancer, the following credit line style applies:**

Reprinted/adapted/translated by permission from [the Licensors]: on behalf of Cancer Research UK: : [Journal Publisher (e.g. Nature/Springer/Palgrave)] [JOURNAL NAME] [REFERENCE CITATION (Article name, Author(s) Name), [COPYRIGHT] (year of publication)]

### **For Advance Online Publication papers:**

Reprinted by permission from The [the Licensors]: on behalf of Cancer Research UK: [Journal Publisher (e.g. Nature/Springer/Palgrave)] [JOURNAL NAME] [REFERENCE CITATION (Article name, Author(s) Name), [COPYRIGHT] (year of publication), advance online publication, day month year (doi: 10.1038/sj.[JOURNAL ACRONYM].)]

### **For Book content:**

Reprinted/adapted by permission from [the Licensors]: [Book Publisher (e.g. Palgrave Macmillan, Springer etc)] [Book Title] by [Book author(s)] [COPYRIGHT] (year of publication)]

## **Other Conditions:**

Version 1.3

Questions? [customercare@copyright.com](mailto:customercare@copyright.com) or +1-855-239-3415 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.

## ELSEVIER LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Sep 29, 2021

---

---

This Agreement between Fraciele Flores Vit ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.

|                              |                                                                                                                             |
|------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| License Number               | 5158031427848                                                                                                               |
| License date                 | Sep 29, 2021                                                                                                                |
| Licensed Content Publisher   | Elsevier                                                                                                                    |
| Licensed Content Publication | Biomaterials                                                                                                                |
| Licensed Content Title       | Application of a microfluidic chip-based 3D co-culture to test drug sensitivity for individualized treatment of lung cancer |
| Licensed Content Author      | Zhiyun Xu, Yanghui Gao, Yuanyuan Hao, Encheng Li, Yan Wang, Jianing Zhang, Wenxin Wang, Zhancheng Gao, Qi Wang              |
| Licensed Content Date        | May 1, 2013                                                                                                                 |
| Licensed Content Volume      | 34                                                                                                                          |
| Licensed Content Issue       | 16                                                                                                                          |
| Licensed Content Pages       | 9                                                                                                                           |
| Start Page                   | 4109                                                                                                                        |
| End Page                     | 4117                                                                                                                        |
| Type of Use                  | reuse in a thesis/dissertation                                                                                              |

|                                              |                                                                                                                       |
|----------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Portion                                      | figures/tables/illustrations                                                                                          |
| Number of figures/tables/illustrations       | 1                                                                                                                     |
| Format                                       | both print and electronic                                                                                             |
| Are you the author of this Elsevier article? | No                                                                                                                    |
| Will you be translating?                     | No                                                                                                                    |
| Title                                        | Microfluidic microdevice to study the behavior cells in the presence of different concentrations of drugs             |
| Institution name                             | University of Campinas                                                                                                |
| Expected presentation date                   | Dec 2021                                                                                                              |
| Order reference number                       | Figure 1                                                                                                              |
| Portions                                     | Figure 1                                                                                                              |
| Requestor Location                           | Fraciele Flores Vit<br>Av Anchieta 369-Centro<br>Campinas, São Paulo 13015-101<br>Brazil<br>Attn: Fraciele Flores Vit |
| Publisher Tax ID                             | GB 494 6272 12                                                                                                        |
| Total                                        | 0.00 USD                                                                                                              |
| Terms and Conditions                         |                                                                                                                       |

## INTRODUCTION

1. The publisher for this copyrighted material is Elsevier. By clicking "accept" in connection with completing this licensing transaction, you agree that the following terms and conditions apply to this transaction (along with the Billing and Payment terms and conditions

established by Copyright Clearance Center, Inc. ("CCC"), at the time that you opened your Rightslink account and that are available at any time at <http://myaccount.copyright.com>).

## GENERAL TERMS

2. Elsevier hereby grants you permission to reproduce the aforementioned material subject to the terms and conditions indicated.

3. Acknowledgement: If any part of the material to be used (for example, figures) has appeared in our publication with credit or acknowledgement to another source, permission must also be sought from that source. If such permission is not obtained then that material may not be included in your publication/copies. Suitable acknowledgement to the source must be made, either as a footnote or in a reference list at the end of your publication, as follows:

"Reprinted from Publication title, Vol /edition number, Author(s), Title of article / title of chapter, Pages No., Copyright (Year), with permission from Elsevier [OR APPLICABLE SOCIETY COPYRIGHT OWNER]." Also Lancet special credit - "Reprinted from The Lancet, Vol. number, Author(s), Title of article, Pages No., Copyright (Year), with permission from Elsevier."

4. Reproduction of this material is confined to the purpose and/or media for which permission is hereby given.

5. Altering/Modifying Material: Not Permitted. However figures and illustrations may be altered/adapted minimally to serve your work. Any other abbreviations, additions, deletions and/or any other alterations shall be made only with prior written authorization of Elsevier Ltd. (Please contact Elsevier's permissions helpdesk [here](#)). No modifications can be made to any Lancet figures/tables and they must be reproduced in full.

6. If the permission fee for the requested use of our material is waived in this instance, please be advised that your future requests for Elsevier materials may attract a fee.

7. Reservation of Rights: Publisher reserves all rights not specifically granted in the combination of (i) the license details provided by you and accepted in the course of this licensing transaction, (ii) these terms and conditions and (iii) CCC's Billing and Payment terms and conditions.

8. License Contingent Upon Payment: While you may exercise the rights licensed immediately upon issuance of the license at the end of the licensing process for the transaction, provided that you have disclosed complete and accurate details of your proposed use, no license is finally effective unless and until full payment is received from you (either by publisher or by CCC) as provided in CCC's Billing and Payment terms and conditions. If full payment is not received on a timely basis, then any license preliminarily granted shall be deemed automatically revoked and shall be void as if never granted. Further, in the event that you breach any of these terms and conditions or any of CCC's Billing and Payment terms and conditions, the license is automatically revoked and shall be void as if never granted. Use of materials as described in a revoked license, as well as any use of the materials beyond the scope of an unrevoked license, may constitute copyright infringement and publisher reserves the right to take any and all action to protect its copyright in the materials.

9. Warranties: Publisher makes no representations or warranties with respect to the licensed material.

10. Indemnity: You hereby indemnify and agree to hold harmless publisher and CCC, and their respective officers, directors, employees and agents, from and against any and all claims arising out of your use of the licensed material other than as specifically authorized pursuant to this license.

11. **No Transfer of License:** This license is personal to you and may not be sublicensed, assigned, or transferred by you to any other person without publisher's written permission.

12. **No Amendment Except in Writing:** This license may not be amended except in a writing signed by both parties (or, in the case of publisher, by CCC on publisher's behalf).

13. **Objection to Contrary Terms:** Publisher hereby objects to any terms contained in any purchase order, acknowledgment, check endorsement or other writing prepared by you, which terms are inconsistent with these terms and conditions or CCC's Billing and Payment terms and conditions. These terms and conditions, together with CCC's Billing and Payment terms and conditions (which are incorporated herein), comprise the entire agreement between you and publisher (and CCC) concerning this licensing transaction. In the event of any conflict between your obligations established by these terms and conditions and those established by CCC's Billing and Payment terms and conditions, these terms and conditions shall control.

14. **Revocation:** Elsevier or Copyright Clearance Center may deny the permissions described in this License at their sole discretion, for any reason or no reason, with a full refund payable to you. Notice of such denial will be made using the contact information provided by you. Failure to receive such notice will not alter or invalidate the denial. In no event will Elsevier or Copyright Clearance Center be responsible or liable for any costs, expenses or damage incurred by you as a result of a denial of your permission request, other than a refund of the amount(s) paid by you to Elsevier and/or Copyright Clearance Center for denied permissions.

### LIMITED LICENSE

The following terms and conditions apply only to specific license types:

15. **Translation:** This permission is granted for non-exclusive world **English** rights only unless your license was granted for translation rights. If you licensed translation rights you may only translate this content into the languages you requested. A professional translator must perform all translations and reproduce the content word for word preserving the integrity of the article.

16. **Posting licensed content on any Website:** The following terms and conditions apply as follows: Licensing material from an Elsevier journal: All content posted to the web site must maintain the copyright information line on the bottom of each image; A hyper-text must be included to the Homepage of the journal from which you are licensing at <http://www.sciencedirect.com/science/journal/xxxxx> or the Elsevier homepage for books at <http://www.elsevier.com>; Central Storage: This license does not include permission for a scanned version of the material to be stored in a central repository such as that provided by Heron/XanEdu.

Licensing material from an Elsevier book: A hyper-text link must be included to the Elsevier homepage at <http://www.elsevier.com>. All content posted to the web site must maintain the copyright information line on the bottom of each image.

**Posting licensed content on Electronic reserve:** In addition to the above the following clauses are applicable: The web site must be password-protected and made available only to bona fide students registered on a relevant course. This permission is granted for 1 year only. You may obtain a new license for future website posting.

17. **For journal authors:** the following clauses are applicable in addition to the above:

**Preprints:**

A preprint is an author's own write-up of research results and analysis, it has not been peer-reviewed, nor has it had any other value added to it by a publisher (such as formatting, copyright, technical enhancement etc.).

Authors can share their preprints anywhere at any time. Preprints should not be added to or enhanced in any way in order to appear more like, or to substitute for, the final versions of articles however authors can update their preprints on arXiv or RePEc with their Accepted Author Manuscript (see below).

If accepted for publication, we encourage authors to link from the preprint to their formal publication via its DOI. Millions of researchers have access to the formal publications on ScienceDirect, and so links will help users to find, access, cite and use the best available version. Please note that Cell Press, The Lancet and some society-owned have different preprint policies. Information on these policies is available on the journal homepage.

**Accepted Author Manuscripts:** An accepted author manuscript is the manuscript of an article that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and editor-author communications.

Authors can share their accepted author manuscript:

- immediately
  - via their non-commercial person homepage or blog
  - by updating a preprint in arXiv or RePEc with the accepted manuscript
  - via their research institute or institutional repository for internal institutional uses or as part of an invitation-only research collaboration work-group
  - directly by providing copies to their students or to research collaborators for their personal use
  - for private scholarly sharing as part of an invitation-only work group on commercial sites with which Elsevier has an agreement
- After the embargo period
  - via non-commercial hosting platforms such as their institutional repository
  - via commercial sites with which Elsevier has an agreement

In all cases accepted manuscripts should:

- link to the formal publication via its DOI
- bear a CC-BY-NC-ND license - this is easy to do
- if aggregated with other manuscripts, for example in a repository or other site, be shared in alignment with our hosting policy not be added to or enhanced in any way to appear more like, or to substitute for, the published journal article.

**Published journal article (JPA):** A published journal article (PJA) is the definitive final record of published research that appears or will appear in the journal and embodies all value-adding publishing activities including peer review co-ordination, copy-editing, formatting, (if relevant) pagination and online enrichment.

Policies for sharing publishing journal articles differ for subscription and gold open access articles:

**Subscription Articles:** If you are an author, please share a link to your article rather than the full-text. Millions of researchers have access to the formal publications on ScienceDirect, and so links will help your users to find, access, cite, and use the best available version.

Theses and dissertations which contain embedded PJAs as part of the formal submission can be posted publicly by the awarding institution with DOI links back to the formal publications on ScienceDirect.

If you are affiliated with a library that subscribes to ScienceDirect you have additional private sharing rights for others' research accessed under that agreement. This includes use for classroom teaching and internal training at the institution (including use in course packs and courseware programs), and inclusion of the article for grant funding purposes.

**Gold Open Access Articles:** May be shared according to the author-selected end-user license and should contain a [CrossMark logo](#), the end user license, and a DOI link to the formal publication on ScienceDirect.

Please refer to Elsevier's [posting.policy](#) for further information.

**18. For book authors** the following clauses are applicable in addition to the above: Authors are permitted to place a brief summary of their work online only. You are not allowed to download and post the published electronic version of your chapter, nor may you scan the printed edition to create an electronic version. **Posting to a repository:** Authors are permitted to post a summary of their chapter only in their institution's repository.

**19. Thesis/Dissertation:** If your license is for use in a thesis/dissertation your thesis may be submitted to your institution in either print or electronic form. Should your thesis be published commercially, please reapply for permission. These requirements include permission for the Library and Archives of Canada to supply single copies, on demand, of the complete thesis and include permission for Proquest/UMI to supply single copies, on demand, of the complete thesis. Should your thesis be published commercially, please reapply for permission. Theses and dissertations which contain embedded PJAs as part of the formal submission can be posted publicly by the awarding institution with DOI links back to the formal publications on ScienceDirect.

### **Elsevier Open Access Terms and Conditions**

You can publish open access with Elsevier in hundreds of open access journals or in nearly 2000 established subscription journals that support open access publishing. Permitted third party re-use of these open access articles is defined by the author's choice of Creative Commons user license. See our [open access license policy](#) for more information.

### **Terms & Conditions applicable to all Open Access articles published with Elsevier:**

Any reuse of the article must not represent the author as endorsing the adaptation of the article nor should the article be modified in such a way as to damage the author's honour or reputation. If any changes have been made, such changes must be clearly indicated.

The author(s) must be appropriately credited and we ask that you include the end user license and a DOI link to the formal publication on ScienceDirect.

If any part of the material to be used (for example, figures) has appeared in our publication with credit or acknowledgement to another source it is the responsibility of the user to ensure their reuse complies with the terms and conditions determined by the rights holder.

### **Additional Terms & Conditions applicable to each Creative Commons user license:**

**CC BY:** The CC-BY license allows users to copy, to create extracts, abstracts and new works from the Article, to alter and revise the Article and to make commercial use of the Article (including reuse and/or resale of the Article by commercial entities), provided the user gives appropriate credit (with a link to the formal publication through the relevant DOI), provides a link to the license, indicates if changes were made and the licensor is not represented as endorsing the use made of the work. The full details of the license are available at <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>.

**CC BY NC SA:** The CC BY-NC-SA license allows users to copy, to create extracts, abstracts and new works from the Article, to alter and revise the Article, provided this is not done for commercial purposes, and that the user gives appropriate credit (with a link to the formal publication through the relevant DOI), provides a link to the license, indicates if changes were made and the licensor is not represented as endorsing the use made of the work. Further, any new works must be made available on the same conditions. The full details of the license are available at <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0>.

**CC BY NC ND:** The CC BY-NC-ND license allows users to copy and distribute the Article, provided this is not done for commercial purposes and further does not permit distribution of the Article if it is changed or edited in any way, and provided the user gives appropriate credit (with a link to the formal publication through the relevant DOI), provides a link to the license, and that the licensor is not represented as endorsing the use made of the work. The full details of the license are available at <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0>. Any commercial reuse of Open Access articles published with a CC BY NC SA or CC BY NC ND license requires permission from Elsevier and will be subject to a fee.

Commercial reuse includes:

- Associating advertising with the full text of the Article
- Charging fees for document delivery or access
- Article aggregation
- Systematic distribution via e-mail lists or share buttons

Posting or linking by commercial companies for use by customers of those companies.

## 20. Other Conditions:

v1.10

Questions? [customercare@copyright.com](mailto:customercare@copyright.com) or +1-855-239-3415 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.



This is a License Agreement between Franciele Flores Vit ("User") and Copyright Clearance Center, Inc. ("CCC") on behalf of the Rightsholder identified in the order details below. The license consists of the order details, the CCC Terms and Conditions below, and any Rightsholder Terms and Conditions which are included below.

All payments must be made in full to CCC in accordance with the CCC Terms and Conditions below.

|                  |             |             |                                    |
|------------------|-------------|-------------|------------------------------------|
| Order Date       | 29-Sep-2021 | Type of Use | Republish in a thesis/dissertation |
| Order License ID | 1151039-1   | Publisher   | ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY         |
| ISSN             | 1473-0197   | Portion     | Image/photo/illustration           |

## LICENSED CONTENT

|                   |                                                                                                        |                  |                            |
|-------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|----------------------------|
| Publication Title | Lab on a chip                                                                                          | Rightsholder     | Royal Society of Chemistry |
| Article Title     | Microfluidics 3D gel-island chip for single cell isolation and lineage-dependent drug responses study. | Publication Type | Journal                    |
|                   |                                                                                                        | Start Page       | 2504                       |
|                   |                                                                                                        | End Page         | 2512                       |
|                   |                                                                                                        | Issue            | 13                         |
| Author/Editor     | Royal Society of Chemistry (Great Britain)                                                             | Volume           | 16                         |
| Date              | 01/01/2001                                                                                             |                  |                            |
| Language          | English                                                                                                |                  |                            |
| Country           | United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland                                                   |                  |                            |

## REQUEST DETAILS

|                                           |                          |                             |                         |
|-------------------------------------------|--------------------------|-----------------------------|-------------------------|
| Portion Type                              | Image/photo/illustration | Distribution                | Worldwide               |
| Number of images / photos / illustrations | 1                        | Translation                 | Other translation needs |
| Format (select all that apply)            | Print, Electronic        | Enter languages             | portuguese              |
| Who will republish the content?           | Academic institution     | Copies for the disabled?    | No                      |
| Duration of Use                           | Life of current edition  | Minor editing privileges?   | Yes                     |
| Lifetime Unit Quantity                    | Up to 499                | Incidental promotional use? | No                      |
| Rights Requested                          | Main product             | Currency                    | USD                     |

## NEW WORK DETAILS

|                 |                                                                                                           |                            |                        |
|-----------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------|------------------------|
| Title           | Microfluidic microdevice to study the behavior cells in the presence of different concentrations of drugs | Institution name           | University of Campinas |
|                 |                                                                                                           | Expected presentation date | 2021-12-08             |
| Instructor name | Lucimara Gaziola de la Torre                                                                              |                            |                        |

## ADDITIONAL DETAILS

|                        |     |
|------------------------|-----|
| Order reference number | N/A |
|------------------------|-----|

The requesting person /  
organization to appear  
on the license

Franciele Flores Vit

## REUSE CONTENT DETAILS

|                                                                  |                                                                        |                                                         |                                                                                                        |
|------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Title, description or numeric reference of the portion(s)</b> | Figure 1                                                               | <b>Title of the article/chapter the portion is from</b> | Microfluidics 3D gel-island chip for single cell isolation and lineage-dependent drug responses study. |
| <b>Editor of portion(s)</b>                                      | Zhang, Zhixiong; Chen, Yu-Chih; Cheng, Yu-Heng; Luan, Yi; Yoon, Euisik | <b>Author of portion(s)</b>                             | Zhang, Zhixiong; Chen, Yu-Chih; Cheng, Yu-Heng; Luan, Yi; Yoon, Euisik                                 |
| <b>Volume of serial or monograph</b>                             | 16                                                                     | <b>Issue, if republishing an article from a serial</b>  | 13                                                                                                     |
| <b>Page or page range of portion</b>                             | 2504-2512                                                              | <b>Publication date of portion</b>                      | 2016-07-07                                                                                             |

## SPECIAL RIGHTSHOLDER TERMS AND CONDITIONS

Permission is granted as long as the figure is fully acknowledged and a link is given back to the article on our Platform. Please go to [rsc.li/permissions](https://rsc.li/permissions) for details. Please note that if the material specified above or any part of it appears with credit or acknowledgement to a third party then you must also secure permission from that third party before reproducing that material.

## CCC Terms and Conditions

1. Description of Service; Defined Terms. This Republication License enables the User to obtain licenses for republication of one or more copyrighted works as described in detail on the relevant Order Confirmation (the "Work(s)"). Copyright Clearance Center, Inc. ("CCC") grants licenses through the Service on behalf of the rightsholder identified on the Order Confirmation (the "Rightsholder"). "Republication", as used herein, generally means the inclusion of a Work, in whole or in part, in a new work or works, also as described on the Order Confirmation. "User", as used herein, means the person or entity making such republication.
2. The terms set forth in the relevant Order Confirmation, and any terms set by the Rightsholder with respect to a particular Work, govern the terms of use of Works in connection with the Service. By using the Service, the person transacting for a republication license on behalf of the User represents and warrants that he/she/it (a) has been duly authorized by the User to accept, and hereby does accept, all such terms and conditions on behalf of User, and (b) shall inform User of all such terms and conditions. In the event such person is a "freelancer" or other third party independent of User and CCC, such party shall be deemed jointly a "User" for purposes of these terms and conditions. In any event, User shall be deemed to have accepted and agreed to all such terms and conditions if User republishes the Work in any fashion.
3. Scope of License; Limitations and Obligations.
  - 3.1. All Works and all rights therein, including copyright rights, remain the sole and exclusive property of the Rightsholder. The license created by the exchange of an Order Confirmation (and/or any invoice) and payment by User of the full amount set forth on that document includes only those rights expressly set forth in the Order Confirmation and in these terms and conditions, and conveys no other rights in the Work(s) to User. All rights not expressly granted are hereby reserved.
  - 3.2. General Payment Terms: You may pay by credit card or through an account with us payable at the end of the month. If you and we agree that you may establish a standing account with CCC, then the following terms apply: Remit Payment to: Copyright Clearance Center, 29118 Network Place, Chicago, IL 60673-1291. Payments Due: Invoices are payable upon their delivery to you (or upon our notice to you that they are available to you for downloading). After 30 days, outstanding amounts will be subject to a service charge of 1-1/2% per month or, if less, the maximum rate allowed by applicable law. Unless otherwise specifically set forth in the Order Confirmation or in a separate written agreement signed by CCC, invoices are due and payable on "net 30" terms. While User may exercise the rights licensed immediately upon issuance of the Order Confirmation, the license is automatically revoked and is null and void, as if it had never been

issued, if complete payment for the license is not received on a timely basis either from User directly or through a payment agent, such as a credit card company.

3.3. Unless otherwise provided in the Order Confirmation, any grant of rights to User (i) is "one-time" (including the editions and product family specified in the license), (ii) is non-exclusive and non-transferable and (iii) is subject to any and all limitations and restrictions (such as, but not limited to, limitations on duration of use or circulation) included in the Order Confirmation or invoice and/or in these terms and conditions. Upon completion of the licensed use, User shall either secure a new permission for further use of the Work(s) or immediately cease any new use of the Work(s) and shall render inaccessible (such as by deleting or by removing or severing links or other locators) any further copies of the Work (except for copies printed on paper in accordance with this license and still in User's stock at the end of such period).

3.4. In the event that the material for which a republication license is sought includes third party materials (such as photographs, illustrations, graphs, inserts and similar materials) which are identified in such material as having been used by permission, User is responsible for identifying, and seeking separate licenses (under this Service or otherwise) for, any of such third party materials; without a separate license, such third party materials may not be used.

3.5. Use of proper copyright notice for a Work is required as a condition of any license granted under the Service. Unless otherwise provided in the Order Confirmation, a proper copyright notice will read substantially as follows: "Republished with permission of [Rightsholder's name], from [Work's title, author, volume, edition number and year of copyright]; permission conveyed through Copyright Clearance Center, Inc. " Such notice must be provided in a reasonably legible font size and must be placed either immediately adjacent to the Work as used (for example, as part of a by-line or footnote but not as a separate electronic link) or in the place where substantially all other credits or notices for the new work containing the republished Work are located. Failure to include the required notice results in loss to the Rightsholder and CCC, and the User shall be liable to pay liquidated damages for each such failure equal to twice the use fee specified in the Order Confirmation, in addition to the use fee itself and any other fees and charges specified.

3.6. User may only make alterations to the Work if and as expressly set forth in the Order Confirmation. No Work may be used in any way that is defamatory, violates the rights of third parties (including such third parties' rights of copyright, privacy, publicity, or other tangible or intangible property), or is otherwise illegal, sexually explicit or obscene. In addition, User may not conjoin a Work with any other material that may result in damage to the reputation of the Rightsholder. User agrees to inform CCC if it becomes aware of any infringement of any rights in a Work and to cooperate with any reasonable request of CCC or the Rightsholder in connection therewith.

4. Indemnity. User hereby indemnifies and agrees to defend the Rightsholder and CCC, and their respective employees and directors, against all claims, liability, damages, costs and expenses, including legal fees and expenses, arising out of any use of a Work beyond the scope of the rights granted herein, or any use of a Work which has been altered in any unauthorized way by User, including claims of defamation or infringement of rights of copyright, publicity, privacy or other tangible or intangible property.
5. Limitation of Liability. UNDER NO CIRCUMSTANCES WILL CCC OR THE RIGHTSHOLDER BE LIABLE FOR ANY DIRECT, INDIRECT, CONSEQUENTIAL OR INCIDENTAL DAMAGES (INCLUDING WITHOUT LIMITATION DAMAGES FOR LOSS OF BUSINESS PROFITS OR INFORMATION, OR FOR BUSINESS INTERRUPTION) ARISING OUT OF THE USE OR INABILITY TO USE A WORK, EVEN IF ONE OF THEM HAS BEEN ADVISED OF THE POSSIBILITY OF SUCH DAMAGES. In any event, the total liability of the Rightsholder and CCC (including their respective employees and directors) shall not exceed the total amount actually paid by User for this license. User assumes full liability for the actions and omissions of its principals, employees, agents, affiliates, successors and assigns.
6. Limited Warranties. THE WORK(S) AND RIGHT(S) ARE PROVIDED "AS IS". CCC HAS THE RIGHT TO GRANT TO USER THE RIGHTS GRANTED IN THE ORDER CONFIRMATION DOCUMENT. CCC AND THE RIGHTSHOLDER DISCLAIM ALL OTHER WARRANTIES RELATING TO THE WORK(S) AND RIGHT(S), EITHER EXPRESS OR IMPLIED, INCLUDING WITHOUT LIMITATION IMPLIED WARRANTIES OF MERCHANTABILITY OR FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE. ADDITIONAL RIGHTS MAY BE REQUIRED TO USE ILLUSTRATIONS, GRAPHS, PHOTOGRAPHS, ABSTRACTS, INSERTS OR OTHER PORTIONS OF THE WORK (AS OPPOSED TO THE ENTIRE WORK) IN A MANNER CONTEMPLATED BY USER; USER UNDERSTANDS AND AGREES THAT NEITHER CCC NOR THE RIGHTSHOLDER MAY HAVE SUCH ADDITIONAL RIGHTS TO GRANT.

7.

Effect of Breach. Any failure by User to pay any amount when due, or any use by User of a Work beyond the scope of the license set forth in the Order Confirmation and/or these terms and conditions, shall be a material breach of the license created by the Order Confirmation and these terms and conditions. Any breach not cured within 30 days of written notice thereof shall result in immediate termination of such license without further notice. Any unauthorized (but licensable) use of a Work that is terminated immediately upon notice thereof may be liquidated by payment of the Rightsholder's ordinary license price therefor; any unauthorized (and unlicensable) use that is not terminated immediately for any reason (including, for example, because materials containing the Work cannot reasonably be recalled) will be subject to all remedies available at law or in equity, but in no event to a payment of less than three times the Rightsholder's ordinary license price for the most closely analogous licensable use plus Rightsholder's and/or CCC's costs and expenses incurred in collecting such payment.

#### 8. Miscellaneous.

- 8.1. User acknowledges that CCC may, from time to time, make changes or additions to the Service or to these terms and conditions, and CCC reserves the right to send notice to the User by electronic mail or otherwise for the purposes of notifying User of such changes or additions; provided that any such changes or additions shall not apply to permissions already secured and paid for.
- 8.2. Use of User-related information collected through the Service is governed by CCC's privacy policy, available online here:<https://marketplace.copyright.com/rs-ui-web/mp/privacy-policy>
- 8.3. The licensing transaction described in the Order Confirmation is personal to User. Therefore, User may not assign or transfer to any other person (whether a natural person or an organization of any kind) the license created by the Order Confirmation and these terms and conditions or any rights granted hereunder; provided, however, that User may assign such license in its entirety on written notice to CCC in the event of a transfer of all or substantially all of User's rights in the new material which includes the Work(s) licensed under this Service.
- 8.4. No amendment or waiver of any terms is binding unless set forth in writing and signed by the parties. The Rightsholder and CCC hereby object to any terms contained in any writing prepared by the User or its principals, employees, agents or affiliates and purporting to govern or otherwise relate to the licensing transaction described in the Order Confirmation, which terms are in any way inconsistent with any terms set forth in the Order Confirmation and/or in these terms and conditions or CCC's standard operating procedures, whether such writing is prepared prior to, simultaneously with or subsequent to the Order Confirmation, and whether such writing appears on a copy of the Order Confirmation or in a separate instrument.
- 8.5. The licensing transaction described in the Order Confirmation document shall be governed by and construed under the law of the State of New York, USA, without regard to the principles thereof of conflicts of law. Any case, controversy, suit, action, or proceeding arising out of, in connection with, or related to such licensing transaction shall be brought, at CCC's sole discretion, in any federal or state court located in the County of New York, State of New York, USA, or in any federal or state court whose geographical jurisdiction covers the location of the Rightsholder set forth in the Order Confirmation. The parties expressly submit to the personal jurisdiction and venue of each such federal or state court. If you have any comments or questions about the Service or Copyright Clearance Center, please contact us at 978-750-8400 or send an e-mail to [support@copyright.com](mailto:support@copyright.com).



This is a License Agreement between Franciele Flores Vit ("User") and Copyright Clearance Center, Inc. ("CCC") on behalf of the Rightsholder identified in the order details below. The license consists of the order details, the CCC Terms and Conditions below, and any Rightsholder Terms and Conditions which are included below.

All payments must be made in full to CCC in accordance with the CCC Terms and Conditions below.

|                  |             |             |                                    |
|------------------|-------------|-------------|------------------------------------|
| Order Date       | 29-Sep-2021 | Type of Use | Republish in a thesis/dissertation |
| Order License ID | 1150901-1   | Publisher   | ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY         |
| ISSN             | 1473-0197   | Portion     | Image/photo/illustration           |

## LICENSED CONTENT

|                   |                                                                                                                  |                  |                                                      |
|-------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|------------------------------------------------------|
| Publication Title | Lab on a chip                                                                                                    | Language         | English                                              |
| Article Title     | A high-throughput, open-space and reusable microfluidic chip for combinational drug screening on tumor spheroids | Country          | United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland |
|                   |                                                                                                                  | Rightsholder     | Royal Society of Chemistry                           |
|                   |                                                                                                                  | Publication Type | Journal                                              |
| Author/Editor     | Royal Society of Chemistry (Great Britain)                                                                       |                  |                                                      |
| Date              | 01/01/2001                                                                                                       |                  |                                                      |

## REQUEST DETAILS

|                                           |                          |                             |                                  |
|-------------------------------------------|--------------------------|-----------------------------|----------------------------------|
| Portion Type                              | Image/photo/illustration | Distribution                | Worldwide                        |
| Number of images / photos / illustrations | 1                        | Translation                 | Original language of publication |
| Format (select all that apply)            | Print, Electronic        | Copies for the disabled?    | No                               |
| Who will republish the content?           | Academic institution     | Minor editing privileges?   | Yes                              |
| Duration of Use                           | Life of current edition  | Incidental promotional use? | No                               |
| Lifetime Unit Quantity                    | Up to 499                | Currency                    | USD                              |
| Rights Requested                          | Main product             |                             |                                  |

## NEW WORK DETAILS

|                 |                                                                                                           |                            |                        |
|-----------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------|------------------------|
| Title           | Microfluidic microdevice to study the behavior cells in the presence of different concentrations of drugs | Institution name           | University of Campinas |
|                 |                                                                                                           | Expected presentation date | 2021-12-08             |
| Instructor name | Lucimara Gaziola de la Torre                                                                              |                            |                        |

## ADDITIONAL DETAILS

|                        |     |                                                               |                      |
|------------------------|-----|---------------------------------------------------------------|----------------------|
| Order reference number | N/A | The requesting person / organization to appear on the license | Franciele Flores Vit |
|------------------------|-----|---------------------------------------------------------------|----------------------|

## REUSE CONTENT DETAILS

|                                                                  |                                                                        |                                                         |                                                                                                                  |
|------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Title, description or numeric reference of the portion(s)</b> | Figure 1                                                               | <b>Title of the article/chapter the portion is from</b> | A high-throughput, open-space and reusable microfluidic chip for combinational drug screening on tumor spheroids |
| <b>Editor of portion(s)</b>                                      | Li, Lijun; Chen, Yan; Wang, Huirong; An, Geng; Wu, Hongkai; Huang, Wei | <b>Author of portion(s)</b>                             | Li, Lijun; Chen, Yan; Wang, Huirong; An, Geng; Wu, Hongkai; Huang, Wei                                           |
| <b>Volume of serial or monograph</b>                             | N/A                                                                    | <b>Issue, if republishing an article from a serial</b>  | N/A                                                                                                              |
| <b>Page or page range of portion</b>                             | 3                                                                      | <b>Publication date of portion</b>                      | 2021-01-01                                                                                                       |

## CCC Terms and Conditions

1. Description of Service; Defined Terms. This Republication License enables the User to obtain licenses for republication of one or more copyrighted works as described in detail on the relevant Order Confirmation (the "Work(s)"). Copyright Clearance Center, Inc. ("CCC") grants licenses through the Service on behalf of the rightsholder identified on the Order Confirmation (the "Rightsholder"). "Republication", as used herein, generally means the inclusion of a Work, in whole or in part, in a new work or works, also as described on the Order Confirmation. "User", as used herein, means the person or entity making such republication.
2. The terms set forth in the relevant Order Confirmation, and any terms set by the Rightsholder with respect to a particular Work, govern the terms of use of Works in connection with the Service. By using the Service, the person transacting for a republication license on behalf of the User represents and warrants that he/she/it (a) has been duly authorized by the User to accept, and hereby does accept, all such terms and conditions on behalf of User, and (b) shall inform User of all such terms and conditions. In the event such person is a "freelancer" or other third party independent of User and CCC, such party shall be deemed jointly a "User" for purposes of these terms and conditions. In any event, User shall be deemed to have accepted and agreed to all such terms and conditions if User republishes the Work in any fashion.
3. Scope of License; Limitations and Obligations.
  - 3.1. All Works and all rights therein, including copyright rights, remain the sole and exclusive property of the Rightsholder. The license created by the exchange of an Order Confirmation (and/or any invoice) and payment by User of the full amount set forth on that document includes only those rights expressly set forth in the Order Confirmation and in these terms and conditions, and conveys no other rights in the Work(s) to User. All rights not expressly granted are hereby reserved.
  - 3.2. General Payment Terms: You may pay by credit card or through an account with us payable at the end of the month. If you and we agree that you may establish a standing account with CCC, then the following terms apply: Remit Payment to: Copyright Clearance Center, 29118 Network Place, Chicago, IL 60673-1291. Payments Due: Invoices are payable upon their delivery to you (or upon our notice to you that they are available to you for downloading). After 30 days, outstanding amounts will be subject to a service charge of 1-1/2% per month or, if less, the maximum rate allowed by applicable law. Unless otherwise specifically set forth in the Order Confirmation or in a separate written agreement signed by CCC, invoices are due and payable on "net 30" terms. While User may exercise the rights licensed immediately upon issuance of the Order Confirmation, the license is automatically revoked and is null and void, as if it had never been issued, if complete payment for the license is not received on a timely basis either from User directly or through a payment agent, such as a credit card company.
  - 3.3. Unless otherwise provided in the Order Confirmation, any grant of rights to User (i) is "one-time" (including the editions and product family specified in the license), (ii) is non-exclusive and non-transferable and (iii) is subject to any and all limitations and restrictions (such as, but not limited to, limitations on duration of use or circulation) included in the Order Confirmation or invoice and/or in these terms and conditions. Upon completion of the licensed use, User shall either secure a new permission for further use of the Work(s) or immediately cease any new use of the Work(s) and shall render inaccessible (such as by deleting or by removing or severing links or other locators) any further copies of the Work (except for copies printed on paper in accordance with this license and still in User's stock at the end of such period).

3.4.

In the event that the material for which a republication license is sought includes third party materials (such as photographs, illustrations, graphs, inserts and similar materials) which are identified in such material as having been used by permission, User is responsible for identifying, and seeking separate licenses (under this Service or otherwise) for, any of such third party materials; without a separate license, such third party materials may not be used.

- 3.5. Use of proper copyright notice for a Work is required as a condition of any license granted under the Service. Unless otherwise provided in the Order Confirmation, a proper copyright notice will read substantially as follows: "Republished with permission of [Rightsholder's name], from [Work's title, author, volume, edition number and year of copyright]; permission conveyed through Copyright Clearance Center, Inc. " Such notice must be provided in a reasonably legible font size and must be placed either immediately adjacent to the Work as used (for example, as part of a by-line or footnote but not as a separate electronic link) or in the place where substantially all other credits or notices for the new work containing the republished Work are located. Failure to include the required notice results in loss to the Rightsholder and CCC, and the User shall be liable to pay liquidated damages for each such failure equal to twice the use fee specified in the Order Confirmation, in addition to the use fee itself and any other fees and charges specified.
- 3.6. User may only make alterations to the Work if and as expressly set forth in the Order Confirmation. No Work may be used in any way that is defamatory, violates the rights of third parties (including such third parties' rights of copyright, privacy, publicity, or other tangible or intangible property), or is otherwise illegal, sexually explicit or obscene. In addition, User may not conjoin a Work with any other material that may result in damage to the reputation of the Rightsholder. User agrees to inform CCC if it becomes aware of any infringement of any rights in a Work and to cooperate with any reasonable request of CCC or the Rightsholder in connection therewith.
4. Indemnity. User hereby indemnifies and agrees to defend the Rightsholder and CCC, and their respective employees and directors, against all claims, liability, damages, costs and expenses, including legal fees and expenses, arising out of any use of a Work beyond the scope of the rights granted herein, or any use of a Work which has been altered in any unauthorized way by User, including claims of defamation or infringement of rights of copyright, publicity, privacy or other tangible or intangible property.
5. Limitation of Liability. UNDER NO CIRCUMSTANCES WILL CCC OR THE RIGHTSHOLDER BE LIABLE FOR ANY DIRECT, INDIRECT, CONSEQUENTIAL OR INCIDENTAL DAMAGES (INCLUDING WITHOUT LIMITATION DAMAGES FOR LOSS OF BUSINESS PROFITS OR INFORMATION, OR FOR BUSINESS INTERRUPTION) ARISING OUT OF THE USE OR INABILITY TO USE A WORK, EVEN IF ONE OF THEM HAS BEEN ADVISED OF THE POSSIBILITY OF SUCH DAMAGES. In any event, the total liability of the Rightsholder and CCC (including their respective employees and directors) shall not exceed the total amount actually paid by User for this license. User assumes full liability for the actions and omissions of its principals, employees, agents, affiliates, successors and assigns.
6. Limited Warranties. THE WORK(S) AND RIGHT(S) ARE PROVIDED "AS IS". CCC HAS THE RIGHT TO GRANT TO USER THE RIGHTS GRANTED IN THE ORDER CONFIRMATION DOCUMENT. CCC AND THE RIGHTSHOLDER DISCLAIM ALL OTHER WARRANTIES RELATING TO THE WORK(S) AND RIGHT(S), EITHER EXPRESS OR IMPLIED, INCLUDING WITHOUT LIMITATION IMPLIED WARRANTIES OF MERCHANTABILITY OR FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE. ADDITIONAL RIGHTS MAY BE REQUIRED TO USE ILLUSTRATIONS, GRAPHS, PHOTOGRAPHS, ABSTRACTS, INSERTS OR OTHER PORTIONS OF THE WORK (AS OPPOSED TO THE ENTIRE WORK) IN A MANNER CONTEMPLATED BY USER; USER UNDERSTANDS AND AGREES THAT NEITHER CCC NOR THE RIGHTSHOLDER MAY HAVE SUCH ADDITIONAL RIGHTS TO GRANT.
7. Effect of Breach. Any failure by User to pay any amount when due, or any use by User of a Work beyond the scope of the license set forth in the Order Confirmation and/or these terms and conditions, shall be a material breach of the license created by the Order Confirmation and these terms and conditions. Any breach not cured within 30 days of written notice thereof shall result in immediate termination of such license without further notice. Any unauthorized (but licensable) use of a Work that is terminated immediately upon notice thereof may be liquidated by payment of the Rightsholder's ordinary license price therefor; any unauthorized (and unlicensable) use that is not terminated immediately for any reason (including, for example, because materials containing the Work cannot reasonably be recalled) will be subject to all remedies available at law or in equity, but in no event to a payment of less than three times the Rightsholder's ordinary license price for the most closely analogous licensable use plus Rightsholder's and/or CCC's costs and expenses incurred in collecting such payment.
8. Miscellaneous.

- 8.1. User acknowledges that CCC may, from time to time, make changes or additions to the Service or to these terms and conditions, and CCC reserves the right to send notice to the User by electronic mail or otherwise for the purposes of notifying User of such changes or additions; provided that any such changes or additions shall not apply to permissions already secured and paid for.
- 8.2. Use of User-related information collected through the Service is governed by CCC's privacy policy, available online here:<https://marketplace.copyright.com/rs-ui-web/mp/privacy-policy>
- 8.3. The licensing transaction described in the Order Confirmation is personal to User. Therefore, User may not assign or transfer to any other person (whether a natural person or an organization of any kind) the license created by the Order Confirmation and these terms and conditions or any rights granted hereunder; provided, however, that User may assign such license in its entirety on written notice to CCC in the event of a transfer of all or substantially all of User's rights in the new material which includes the Work(s) licensed under this Service.
- 8.4. No amendment or waiver of any terms is binding unless set forth in writing and signed by the parties. The Rightsholder and CCC hereby object to any terms contained in any writing prepared by the User or its principals, employees, agents or affiliates and purporting to govern or otherwise relate to the licensing transaction described in the Order Confirmation, which terms are in any way inconsistent with any terms set forth in the Order Confirmation and/or in these terms and conditions or CCC's standard operating procedures, whether such writing is prepared prior to, simultaneously with or subsequent to the Order Confirmation, and whether such writing appears on a copy of the Order Confirmation or in a separate instrument.
- 8.5. The licensing transaction described in the Order Confirmation document shall be governed by and construed under the law of the State of New York, USA, without regard to the principles thereof of conflicts of law. Any case, controversy, suit, action, or proceeding arising out of, in connection with, or related to such licensing transaction shall be brought, at CCC's sole discretion, in any federal or state court located in the County of New York, State of New York, USA, or in any federal or state court whose geographical jurisdiction covers the location of the Rightsholder set forth in the Order Confirmation. The parties expressly submit to the personal jurisdiction and venue of each such federal or state court. If you have any comments or questions about the Service or Copyright Clearance Center, please contact us at 978-750-8400 or send an e-mail to [support@copyright.com](mailto:support@copyright.com).



?  
Help ▾

✉  
Email Support

### A microfluidics platform for combinatorial drug screening on cancer biopsies

**SPRINGER NATURE**

**Author:** Federica Eduati et al

**Publication:** Nature Communications

**Publisher:** Springer Nature

**Date:** Jun 22, 2018

*Copyright © 2018, The Author(s)*

#### Creative Commons

This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons CC BY](#) license, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

You are not required to obtain permission to reuse this article.

To request permission for a type of use not listed, please contact [Springer Nature](#)

© 2021 Copyright - All Rights Reserved | [Copyright Clearance Center, Inc.](#) | [Privacy statement](#) | [Terms and Conditions](#)  
Comments? We would like to hear from you. E-mail us at [customer@copyright.com](mailto:customer@copyright.com)



This is a License Agreement between Franciele Flores Vit ("User") and Copyright Clearance Center, Inc. ("CCC") on behalf of the Rightsholder identified in the order details below. The license consists of the order details, the CCC Terms and Conditions below, and any Rightsholder Terms and Conditions which are included below.

All payments must be made in full to CCC in accordance with the CCC Terms and Conditions below.

|                  |             |             |                                    |
|------------------|-------------|-------------|------------------------------------|
| Order Date       | 29-Sep-2021 | Type of Use | Republish in a thesis/dissertation |
| Order License ID | 1151137-1   | Publisher   | ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY         |
| ISSN             | 1473-0197   | Portion     | Chart/graph/table/figure           |

## LICENSED CONTENT

|                   |                                                      |                  |                            |
|-------------------|------------------------------------------------------|------------------|----------------------------|
| Publication Title | Lab on a chip                                        | Rightsholder     | Royal Society of Chemistry |
| Article Title     | Organ-on-a-chip devices advance to market.           | Publication Type | Journal                    |
| Author/Editor     | Royal Society of Chemistry (Great Britain)           | Start Page       | 2395                       |
| Date              | 01/01/2001                                           | End Page         | 2420                       |
| Language          | English                                              | Issue            | 14                         |
| Country           | United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland | Volume           | 17                         |

## REQUEST DETAILS

|                                                        |                          |                             |                                  |
|--------------------------------------------------------|--------------------------|-----------------------------|----------------------------------|
| Portion Type                                           | Chart/graph/table/figure | Distribution                | Worldwide                        |
| Number of charts / graphs / tables / figures requested | 1                        | Translation                 | Original language of publication |
| Format (select all that apply)                         | Print, Electronic        | Copies for the disabled?    | No                               |
| Who will republish the content?                        | Academic institution     | Minor editing privileges?   | No                               |
| Duration of Use                                        | Life of current edition  | Incidental promotional use? | No                               |
| Lifetime Unit Quantity                                 | Up to 499                | Currency                    | USD                              |
| Rights Requested                                       | Main product             |                             |                                  |

## NEW WORK DETAILS

|                 |                                                                                                           |                            |                        |
|-----------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------|------------------------|
| Title           | Microfluidic microdevice to study the behavior cells in the presence of different concentrations of drugs | Institution name           | University of Campinas |
| Instructor name | Lucimara Gaziola de la Torre                                                                              | Expected presentation date | 2021-12-08             |

## ADDITIONAL DETAILS

|                        |     |                                                               |                      |
|------------------------|-----|---------------------------------------------------------------|----------------------|
| Order reference number | N/A | The requesting person / organization to appear on the license | Franciele Flores Vit |
|------------------------|-----|---------------------------------------------------------------|----------------------|

## REUSE CONTENT DETAILS

|                                                                  |                                |                                                         |                                            |
|------------------------------------------------------------------|--------------------------------|---------------------------------------------------------|--------------------------------------------|
| <b>Title, description or numeric reference of the portion(s)</b> | Graphical Abstract             | <b>Title of the article/chapter the portion is from</b> | Organ-on-a-chip devices advance to market. |
| <b>Editor of portion(s)</b>                                      | Zhang, Boyang; Radisic, Milica | <b>Author of portion(s)</b>                             | Zhang, Boyang; Radisic, Milica             |
| <b>Volume of serial or monograph</b>                             | 17                             | <b>Issue, if republishing an article from a serial</b>  | 14                                         |
| <b>Page or page range of portion</b>                             | 2395-2420                      | <b>Publication date of portion</b>                      | 2017-07-21                                 |

## CCC Terms and Conditions

1. Description of Service; Defined Terms. This Republication License enables the User to obtain licenses for republication of one or more copyrighted works as described in detail on the relevant Order Confirmation (the "Work(s)"). Copyright Clearance Center, Inc. ("CCC") grants licenses through the Service on behalf of the rightsholder identified on the Order Confirmation (the "Rightsholder"). "Republication", as used herein, generally means the inclusion of a Work, in whole or in part, in a new work or works, also as described on the Order Confirmation. "User", as used herein, means the person or entity making such republication.
2. The terms set forth in the relevant Order Confirmation, and any terms set by the Rightsholder with respect to a particular Work, govern the terms of use of Works in connection with the Service. By using the Service, the person transacting for a republication license on behalf of the User represents and warrants that he/she/it (a) has been duly authorized by the User to accept, and hereby does accept, all such terms and conditions on behalf of User, and (b) shall inform User of all such terms and conditions. In the event such person is a "freelancer" or other third party independent of User and CCC, such party shall be deemed jointly a "User" for purposes of these terms and conditions. In any event, User shall be deemed to have accepted and agreed to all such terms and conditions if User republishes the Work in any fashion.
3. Scope of License; Limitations and Obligations.
  - 3.1. All Works and all rights therein, including copyright rights, remain the sole and exclusive property of the Rightsholder. The license created by the exchange of an Order Confirmation (and/or any invoice) and payment by User of the full amount set forth on that document includes only those rights expressly set forth in the Order Confirmation and in these terms and conditions, and conveys no other rights in the Work(s) to User. All rights not expressly granted are hereby reserved.
  - 3.2. General Payment Terms: You may pay by credit card or through an account with us payable at the end of the month. If you and we agree that you may establish a standing account with CCC, then the following terms apply: Remit Payment to: Copyright Clearance Center, 29118 Network Place, Chicago, IL 60673-1291. Payments Due: Invoices are payable upon their delivery to you (or upon our notice to you that they are available to you for downloading). After 30 days, outstanding amounts will be subject to a service charge of 1-1/2% per month or, if less, the maximum rate allowed by applicable law. Unless otherwise specifically set forth in the Order Confirmation or in a separate written agreement signed by CCC, invoices are due and payable on "net 30" terms. While User may exercise the rights licensed immediately upon issuance of the Order Confirmation, the license is automatically revoked and is null and void, as if it had never been issued, if complete payment for the license is not received on a timely basis either from User directly or through a payment agent, such as a credit card company.
  - 3.3. Unless otherwise provided in the Order Confirmation, any grant of rights to User (i) is "one-time" (including the editions and product family specified in the license), (ii) is non-exclusive and non-transferable and (iii) is subject to any and all limitations and restrictions (such as, but not limited to, limitations on duration of use or circulation) included in the Order Confirmation or invoice and/or in these terms and conditions. Upon completion of the licensed use, User shall either secure a new permission for further use of the Work(s) or immediately cease any new use of the Work(s) and shall render inaccessible (such as by deleting or by removing or severing links or other locators) any further copies of the Work (except for copies printed on paper in accordance with this license and still in User's stock at the end of such period).
  - 3.4. In the event that the material for which a republication license is sought includes third party materials (such as photographs, illustrations, graphs, inserts and similar materials) which are identified in such

material as having been used by permission, User is responsible for identifying, and seeking separate licenses (under this Service or otherwise) for, any of such third party materials; without a separate license, such third party materials may not be used.

3.5. Use of proper copyright notice for a Work is required as a condition of any license granted under the Service. Unless otherwise provided in the Order Confirmation, a proper copyright notice will read substantially as follows: "Republished with permission of [Rightsholder's name], from [Work's title, author, volume, edition number and year of copyright]; permission conveyed through Copyright Clearance Center, Inc. " Such notice must be provided in a reasonably legible font size and must be placed either immediately adjacent to the Work as used (for example, as part of a by-line or footnote but not as a separate electronic link) or in the place where substantially all other credits or notices for the new work containing the republished Work are located. Failure to include the required notice results in loss to the Rightsholder and CCC, and the User shall be liable to pay liquidated damages for each such failure equal to twice the use fee specified in the Order Confirmation, in addition to the use fee itself and any other fees and charges specified.

3.6. User may only make alterations to the Work if and as expressly set forth in the Order Confirmation. No Work may be used in any way that is defamatory, violates the rights of third parties (including such third parties' rights of copyright, privacy, publicity, or other tangible or intangible property), or is otherwise illegal, sexually explicit or obscene. In addition, User may not conjoin a Work with any other material that may result in damage to the reputation of the Rightsholder. User agrees to inform CCC if it becomes aware of any infringement of any rights in a Work and to cooperate with any reasonable request of CCC or the Rightsholder in connection therewith.

4. Indemnity. User hereby indemnifies and agrees to defend the Rightsholder and CCC, and their respective employees and directors, against all claims, liability, damages, costs and expenses, including legal fees and expenses, arising out of any use of a Work beyond the scope of the rights granted herein, or any use of a Work which has been altered in any unauthorized way by User, including claims of defamation or infringement of rights of copyright, publicity, privacy or other tangible or intangible property.

5. Limitation of Liability. UNDER NO CIRCUMSTANCES WILL CCC OR THE RIGHTSHOLDER BE LIABLE FOR ANY DIRECT, INDIRECT, CONSEQUENTIAL OR INCIDENTAL DAMAGES (INCLUDING WITHOUT LIMITATION DAMAGES FOR LOSS OF BUSINESS PROFITS OR INFORMATION, OR FOR BUSINESS INTERRUPTION) ARISING OUT OF THE USE OR INABILITY TO USE A WORK, EVEN IF ONE OF THEM HAS BEEN ADVISED OF THE POSSIBILITY OF SUCH DAMAGES. In any event, the total liability of the Rightsholder and CCC (including their respective employees and directors) shall not exceed the total amount actually paid by User for this license. User assumes full liability for the actions and omissions of its principals, employees, agents, affiliates, successors and assigns.

6. Limited Warranties. THE WORK(S) AND RIGHT(S) ARE PROVIDED "AS IS". CCC HAS THE RIGHT TO GRANT TO USER THE RIGHTS GRANTED IN THE ORDER CONFIRMATION DOCUMENT. CCC AND THE RIGHTSHOLDER DISCLAIM ALL OTHER WARRANTIES RELATING TO THE WORK(S) AND RIGHT(S), EITHER EXPRESS OR IMPLIED, INCLUDING WITHOUT LIMITATION IMPLIED WARRANTIES OF MERCHANTABILITY OR FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE. ADDITIONAL RIGHTS MAY BE REQUIRED TO USE ILLUSTRATIONS, GRAPHS, PHOTOGRAPHS, ABSTRACTS, INSERTS OR OTHER PORTIONS OF THE WORK (AS OPPOSED TO THE ENTIRE WORK) IN A MANNER CONTEMPLATED BY USER; USER UNDERSTANDS AND AGREES THAT NEITHER CCC NOR THE RIGHTSHOLDER MAY HAVE SUCH ADDITIONAL RIGHTS TO GRANT.

7. Effect of Breach. Any failure by User to pay any amount when due, or any use by User of a Work beyond the scope of the license set forth in the Order Confirmation and/or these terms and conditions, shall be a material breach of the license created by the Order Confirmation and these terms and conditions. Any breach not cured within 30 days of written notice thereof shall result in immediate termination of such license without further notice. Any unauthorized (but licensable) use of a Work that is terminated immediately upon notice thereof may be liquidated by payment of the Rightsholder's ordinary license price therefor; any unauthorized (and unlicensable) use that is not terminated immediately for any reason (including, for example, because materials containing the Work cannot reasonably be recalled) will be subject to all remedies available at law or in equity, but in no event to a payment of less than three times the Rightsholder's ordinary license price for the most closely analogous licensable use plus Rightsholder's and/or CCC's costs and expenses incurred in collecting such payment.

8. Miscellaneous.

8.1.

User acknowledges that CCC may, from time to time, make changes or additions to the Service or to these terms and conditions, and CCC reserves the right to send notice to the User by electronic mail or

otherwise for the purposes of notifying User of such changes or additions; provided that any such changes or additions shall not apply to permissions already secured and paid for.

- 8.2. Use of User-related information collected through the Service is governed by CCC's privacy policy, available online here:<https://marketplace.copyright.com/rs-ui-web/mp/privacy-policy>
- 8.3. The licensing transaction described in the Order Confirmation is personal to User. Therefore, User may not assign or transfer to any other person (whether a natural person or an organization of any kind) the license created by the Order Confirmation and these terms and conditions or any rights granted hereunder; provided, however, that User may assign such license in its entirety on written notice to CCC in the event of a transfer of all or substantially all of User's rights in the new material which includes the Work(s) licensed under this Service.
- 8.4. No amendment or waiver of any terms is binding unless set forth in writing and signed by the parties. The Rightsholder and CCC hereby object to any terms contained in any writing prepared by the User or its principals, employees, agents or affiliates and purporting to govern or otherwise relate to the licensing transaction described in the Order Confirmation, which terms are in any way inconsistent with any terms set forth in the Order Confirmation and/or in these terms and conditions or CCC's standard operating procedures, whether such writing is prepared prior to, simultaneously with or subsequent to the Order Confirmation, and whether such writing appears on a copy of the Order Confirmation or in a separate instrument.
- 8.5. The licensing transaction described in the Order Confirmation document shall be governed by and construed under the law of the State of New York, USA, without regard to the principles thereof of conflicts of law. Any case, controversy, suit, action, or proceeding arising out of, in connection with, or related to such licensing transaction shall be brought, at CCC's sole discretion, in any federal or state court located in the County of New York, State of New York, USA, or in any federal or state court whose geographical jurisdiction covers the location of the Rightsholder set forth in the Order Confirmation. The parties expressly submit to the personal jurisdiction and venue of each such federal or state court. If you have any comments or questions about the Service or Copyright Clearance Center, please contact us at 978-750-8400 or send an e-mail to [support@copyright.com](mailto:support@copyright.com).

v 1.1



Franciele.Flores Vit &lt;franciele.floresvit@gmail.com&gt;

---

**THESIS/DISSERTATION USE - SCIENCE FIGURE - HUH ET AL 2010**

1 mensagem

**permissions** <permissions@aaas.org>

14 de outubro de 2021 15:21

Para: "Franciele.Flores Vit" &lt;franciele.floresvit@gmail.com&gt;

Dear Franciele F. Vit:

Thank you very much for your interest in the AAAS material identified in your request.

We are pleased to have you include this material in your thesis or dissertation subject to the following guidelines. These guidelines also appear on our website: <https://www.science.org/content/page/reprints-and-permissions> under the heading 'Using AAAS material in a thesis or dissertation'.

**REPRODUCING AAAS MATERIAL IN YOUR THESIS OR DISSERTATION**

AAAS permits the use of content published in its journals but only provided the following criteria are met:

1. If you are using figures/tables, permission is granted for use in print and electronic versions of your dissertation or thesis.
2. A full text article may be used only in print versions of a dissertation or thesis. AAAS does not permit the reproduction of full text articles in electronic versions of theses or dissertations.
3. The following credit line must be printed along with the AAAS material: "From [Insert Full Reference Citation]/ Reprinted with permission from AAAS".
4. All required credit lines and notices must be visible any time a user accesses any part of the AAAS material and must appear on any printed copies that an authorized user might make.
5. The AAAS material may not be modified or altered except that figures and tables may be modified with permission from the author. Author permission for any such changes must be secured prior to your use.
6. AAAS must publish the full paper prior to your use of any of its text or figures.
7. If the AAAS material covered by this permission was published in *Science* during the years 1974-1994, you must also obtain permission from the author, who may grant or withhold permission, and who may or may not charge a fee if permission is granted. See original article for author's address. This condition does not apply to the news articles published in *Science*.
8. Permission covers the distribution of your dissertation or thesis on demand by a third party distributor (eg ProQuest/UMI), provided the AAAS material covered by this permission remains in situ and is not distributed by that third party outside of the context of your thesis/dissertation.
9. Permission does not apply to figures/photos/artwork or any other content or material included in your work that are credited to non-AAAS sources. If the requested material is sourced to or references non-AAAS sources, you must obtain authorization from that source as well before using that material. You agree to hold harmless and indemnify AAAS against any claims arising from your use of any content in your work that is credited to non-AAAS sources.
10. By using the AAAS Material identified in your request, you agree to abide by all the terms & conditions herein.
11. AAAS makes no representations or warranties as to the accuracy of any information contained in the AAAS material covered by this permission, including any warranties of merchantability or fitness for a particular purpose.

If how you wish to use the content falls outside of these guidelines or if you have any questions, please let me know.

Kind regards,

Liz

\*\*\*

Elizabeth Sandler (Ms.)

Rights & Permissions, *Science* family of journals

American Association for the Advancement of Science (AAAS)

1200 New York Avenue

Washington, DC 20005

E: [esandler@aaas.org](mailto:esandler@aaas.org)

Tel: +1-202-326-6765

---

**From:** Franciele.Flores Vit <[franciele.floresvit@gmail.com](mailto:franciele.floresvit@gmail.com)>

**Sent:** Wednesday, September 29, 2021 11:22 PM

**To:** permissions <[permissions@aaas.org](mailto:permissions@aaas.org)>

**Subject:** Copyrights Licence

[EXTERNAL EMAIL]

Dear Editor and Authors

I am writing my Ph.D thesis entitled "Microfluidic microdevice to study the behavior cells in the presence of different concentrations of drugs". The thesis will be presented at University of Campinas -SP-Brazil.

I am writing to kindly request the copyright of the Figure 1 present in ... present in the article " Reconstituting Organ-Level Lung Functions on a Chip", Author: Dongeun Huh, Benjamin D. Matthews, Akiko Mammoto, et al. Junh , 2010. <https://doi.org/10.1126/science.1188302>

I really appreciate using this Figure in my Ph.D. thesis. .

Best wishes,

Franciele

--

Franciele F. Vit, Ph.D Candidate

Master in Chemical Engineering

Department of Bioprocesses and Materials Engineering

School of Chemical Engineering

University of Campinas - Unicamp

## SPRINGER NATURE LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Sep 29, 2021

---

---

This Agreement between Fraciele Flores Vit ("You") and Springer Nature ("Springer Nature") consists of your license details and the terms and conditions provided by Springer Nature and Copyright Clearance Center.

|                                        |                                                                                                             |
|----------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| License Number                         | 5158520181272                                                                                               |
| License date                           | Sep 29, 2021                                                                                                |
| Licensed Content Publisher             | Springer Nature                                                                                             |
| Licensed Content Publication           | Nature Biomedical Engineering                                                                               |
| Licensed Content Title                 | A human-airway-on-a-chip for the rapid identification of candidate antiviral therapeutics and prophylactics |
| Licensed Content Author                | Longlong Si et al                                                                                           |
| Licensed Content Date                  | May 3, 2021                                                                                                 |
| Type of Use                            | Thesis/Dissertation                                                                                         |
| Requestor type                         | academic/university or research institute                                                                   |
| Format                                 | print and electronic                                                                                        |
| Portion                                | figures/tables/illustrations                                                                                |
| Number of figures/tables/illustrations | 1                                                                                                           |
| High-res required                      | no                                                                                                          |

Will you be translating? no

Circulation/distribution 1000 - 1999

Author of this Springer  
Nature content no

Title Microfluidic microdevice to study the behavior cells in the  
presence of different concentrations of drugs

Institution name University of Campinas

Expected presentation  
date Dec 2021

Order reference number Figure 1

Portions Figure 1

Fraciele Flores Vit  
Av Anchieta 369-Centro

Requestor Location  
Campinas, São Paulo 13015-101  
Brazil  
Attn: Fraciele Flores Vit

Total 0.00 USD

Terms and Conditions

### **Springer Nature Customer Service Centre GmbH Terms and Conditions**

This agreement sets out the terms and conditions of the licence (the **Licence**) between you and **Springer Nature Customer Service Centre GmbH** (the **Licensor**). By clicking 'accept' and completing the transaction for the material (**Licensed Material**), you also confirm your acceptance of these terms and conditions.

#### **1. Grant of License**

**1.1.** The Licensor grants you a personal, non-exclusive, non-transferable, world-wide licence to reproduce the Licensed Material for the purpose specified in your order only. Licences are granted for the specific use requested in the order and for no other use, subject to the conditions below.

**1. 2.** The Licensor warrants that it has, to the best of its knowledge, the rights to license reuse of the Licensed Material. However, you should ensure that the material you are requesting is original to the Licensor and does not carry the copyright of another entity (as credited in the published version).

**1. 3.** If the credit line on any part of the material you have requested indicates that it was reprinted or adapted with permission from another source, then you should also seek permission from that source to reuse the material.

## 2. Scope of Licence

**2. 1.** You may only use the Licensed Content in the manner and to the extent permitted by these Ts&Cs and any applicable laws.

**2. 2.** A separate licence may be required for any additional use of the Licensed Material, e.g. where a licence has been purchased for print only use, separate permission must be obtained for electronic re-use. Similarly, a licence is only valid in the language selected and does not apply for editions in other languages unless additional translation rights have been granted separately in the licence. Any content owned by third parties are expressly excluded from the licence.

**2. 3.** Similarly, rights for additional components such as custom editions and derivatives require additional permission and may be subject to an additional fee.

Please apply to

[Journalpermissions@springernature.com/bookpermissions@springernature.com](mailto:Journalpermissions@springernature.com/bookpermissions@springernature.com) for these rights.

**2. 4.** Where permission has been granted **free of charge** for material in print, permission may also be granted for any electronic version of that work, provided that the material is incidental to your work as a whole and that the electronic version is essentially equivalent to, or substitutes for, the print version.

**2. 5.** An alternative scope of licence may apply to signatories of the [STM Permissions Guidelines](#), as amended from time to time.

## 3. Duration of Licence

**3. 1.** A licence for is valid from the date of purchase ('Licence Date') at the end of the relevant period in the below table:

| Scope of Licence   | Duration of Licence                               |
|--------------------|---------------------------------------------------|
| Post on a website  | 12 months                                         |
| Presentations      | 12 months                                         |
| Books and journals | Lifetime of the edition in the language purchased |

## 4. Acknowledgement

**4. 1.** The Licensor's permission must be acknowledged next to the Licenced Material in print. In electronic form, this acknowledgement must be visible at the same time as the figures/tables/illustrations or abstract, and must be hyperlinked to the journal/book's homepage. Our required acknowledgement format is in the Appendix below.

## 5. Restrictions on use

**5. 1.** Use of the Licensed Material may be permitted for incidental promotional use and minor editing privileges e.g. minor adaptations of single figures, changes of format, colour and/or style where the adaptation is credited as set out in Appendix 1 below. Any other changes including but not limited to, cropping, adapting, omitting material that affect the meaning, intention or moral rights of the author are strictly prohibited.

**5. 2.** You must not use any Licensed Material as part of any design or trademark.

**5. 3.** Licensed Material may be used in Open Access Publications (OAP) before publication by Springer Nature, but any Licensed Material must be removed from OAP sites prior to final publication.

## 6. Ownership of Rights

**6. 1.** Licensed Material remains the property of either Licensor or the relevant third party and any rights not explicitly granted herein are expressly reserved.

## 7. Warranty

IN NO EVENT SHALL LICENSOR BE LIABLE TO YOU OR ANY OTHER PARTY OR ANY OTHER PERSON OR FOR ANY SPECIAL, CONSEQUENTIAL, INCIDENTAL OR INDIRECT DAMAGES, HOWEVER CAUSED, ARISING OUT OF OR IN CONNECTION WITH THE DOWNLOADING, VIEWING OR USE OF THE MATERIALS REGARDLESS OF THE FORM OF ACTION, WHETHER FOR BREACH OF CONTRACT, BREACH OF WARRANTY, TORT, NEGLIGENCE, INFRINGEMENT OR OTHERWISE (INCLUDING, WITHOUT LIMITATION, DAMAGES BASED ON LOSS OF PROFITS, DATA, FILES, USE, BUSINESS OPPORTUNITY OR CLAIMS OF THIRD PARTIES), AND WHETHER OR NOT THE PARTY HAS BEEN ADVISED OF THE POSSIBILITY OF SUCH DAMAGES. THIS LIMITATION SHALL APPLY NOTWITHSTANDING ANY FAILURE OF ESSENTIAL PURPOSE OF ANY LIMITED REMEDY PROVIDED HEREIN.

## 8. Limitations

**8. 1. BOOKS ONLY:** Where 'reuse in a dissertation/thesis' has been selected the following terms apply: Print rights of the final author's accepted manuscript (for clarity, NOT the published version) for up to 100 copies, electronic rights for use only on a personal website or institutional repository as defined by the Sherpa guideline ([www.sherpa.ac.uk/romeo/](http://www.sherpa.ac.uk/romeo/)).

**8. 2.** For content reuse requests that qualify for permission under the [STM Permissions Guidelines](#), which may be updated from time to time, the STM Permissions Guidelines supersede the terms and conditions contained in this licence.

## 9. Termination and Cancellation

**9. 1.** Licences will expire after the period shown in Clause 3 (above).

**9. 2.** Licensee reserves the right to terminate the Licence in the event that payment is not received in full or if there has been a breach of this agreement by you.

## **Appendix 1 — Acknowledgements:**

### **For Journal Content:**

Reprinted by permission from [the Licensors]: [Journal Publisher (e.g. Nature/Springer/Palgrave)] [JOURNAL NAME] [REFERENCE CITATION (Article name, Author(s) Name), [COPYRIGHT] (year of publication)]

### **For Advance Online Publication papers:**

Reprinted by permission from [the Licensors]: [Journal Publisher (e.g. Nature/Springer/Palgrave)] [JOURNAL NAME] [REFERENCE CITATION (Article name, Author(s) Name), [COPYRIGHT] (year of publication), advance online publication, day month year (doi: 10.1038/sj.[JOURNAL ACRONYM].)]

### **For Adaptations/Translations:**

Adapted/Translated by permission from [the Licensors]: [Journal Publisher (e.g. Nature/Springer/Palgrave)] [JOURNAL NAME] [REFERENCE CITATION (Article name, Author(s) Name), [COPYRIGHT] (year of publication)]

### **Note: For any republication from the British Journal of Cancer, the following credit line style applies:**

Reprinted/adapted/translated by permission from [the Licensors]: on behalf of Cancer Research UK: : [Journal Publisher (e.g. Nature/Springer/Palgrave)] [JOURNAL NAME] [REFERENCE CITATION (Article name, Author(s) Name), [COPYRIGHT] (year of publication)]

### **For Advance Online Publication papers:**

Reprinted by permission from The [the Licensors]: on behalf of Cancer Research UK: [Journal Publisher (e.g. Nature/Springer/Palgrave)] [JOURNAL NAME] [REFERENCE CITATION (Article name, Author(s) Name), [COPYRIGHT] (year of publication), advance online publication, day month year (doi: 10.1038/sj.[JOURNAL ACRONYM].)]

### **For Book content:**

Reprinted/adapted by permission from [the Licensors]: [Book Publisher (e.g. Palgrave Macmillan, Springer etc)] [Book Title] by [Book author(s)] [COPYRIGHT] (year of publication)]

## **Other Conditions:**

Version 1.3

Questions? [customercare@copyright.com](mailto:customercare@copyright.com) or +1-855-239-3415 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.



Franciele.Flores Vit &lt;franciele.floresvit@gmail.com&gt;

---

## Copyrights Licence

1 mensagem

---

**ACS Publication** <support@services.acs.org>  
Responder a: support@services.acs.org  
Para: franciele.floresvit@gmail.com

30 de setembro de 2021 00:48

Dear Dr. Franciele,

Thank you for contacting ACS Publications Support.

Your permission requested is granted and there is no fee for this reuse. In your planned reuse, you must cite the ACS article as the source, add this direct link <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.nanolett.0c00076>, and include a notice to readers that further permissions related to the material excerpted should be directed to the ACS.

If you need further assistance, please let me know.

Best regards,  
Ranjith Alexander

~~~~~  
Ranjith Alexander  
ACS Publications Support  
Customer Services & Information  
Website: <https://acs.service-now.com/acs>  
Email: [support@services.acs.org](mailto:support@services.acs.org)  
Phone: 800-227-9919 | 202-872-(HELP) 4357

On September 29, 2021 7:06:11 PM PDT, 'franciele.floresvit@gmail.com' wrote:

Dear Editor and Authors

I am writing my Ph.D thesis entitled "Microfluidic microdevice to study the behavior cells in the presence of different concentrations of drugs".

I am writing to kindly request the copyright of the Figure 1 present in ... present in the article "Heart-on-a-Chip Model with Integrated Extra- and Intracellular Bioelectronics for Monitoring Cardiac Electrophysiology under Acute Hypoxia" by Haitao Liu, Olurotimi A. Bolonduro, Ning Hu, Jie Ju, Akshita A. Rao, Breanna M. Duffy, Zhaohui Huang, Lauren D. Black, and Brian P. Timko. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.0c00076>

I really appreciate using this Figure in my Ph.D. thesis. .

Best wishes,  
Franciele

--

Franciele F. Vit, Ph.D Candidate  
Master in Chemical Engineering  
Department of Bioprocesses and Materials Engineering  
School of Chemical Engineering  
University of Campinas - Unicamp

Ref:MSG0190643\_pBMRgSUNrFBEMwDRYhdd



### A modular, reversible sealing, and reusable microfluidic device for drug screening

**Author:**

Franciele Flores Vit,Rony Nunes,Yu Tzu Wu,Marco César Prado Soares,Naiara Godoi,Eric Fujiwara,Hernandes F. Carvalho,Lucimara Gaziola de la Torre

**Publication:** Analytica Chimica Acta

**Publisher:** Elsevier

**Date:** 15 November 2021

© 2021 Elsevier B.V. All rights reserved.

#### Journal Author Rights

Please note that, as the author of this Elsevier article, you retain the right to include it in a thesis or dissertation, provided it is not published commercially. Permission is not required, but please ensure that you reference the journal as the original source. For more information on this and on your other retained rights, please visit: <https://www.elsevier.com/about/our-business/policies/copyright#Author-rights>

[BACK](#)[CLOSE WINDOW](#)