

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

VICTÓRIA D’AMARIO GAVIOLI

**DESENVOLVIMENTO DE DISPOSITIVO MICROFLUÍDICO PARA BIÓPSIA
LÍQUIDA DE CÉLULAS TUMORAIS CIRCULANTES**

Botucatu

2025

VICTÓRIA D'AMARIO GAVIOLI

DESENVOLVIMENTO DE DISPOSITIVO MICROFLUÍDICO PARA BIÓPSIA LÍQUIDA
DE CÉLULAS TUMORAIS CIRCULANTES

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, da Faculdade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” para a obtenção do grau de Mestre

Orientador: Prof. Dr. Valber de Albuquerque Pedrosa

BOTUCATU

2025

D999d

D'Amario Gavioli, Victória

Desenvolvimento de dispositivo microfluídico para biópsia líquida
de células tumorais circulantes / Victória D'Amario Gavioli. --
Botucatu, 2025

77 p. : il., tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP),
Instituto de Biociências, Botucatu

Orientador: Valber de Albuquerque Pedrosa

1. Células Tumorais Circulantes. 2. Meningioma. 3. Glioblastoma.
4. Dispositivo Microfluídico. 5. Biópsia Líquida. I. Título.

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE VICTÓRIA D'AMARIO GAVIOLI, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA, DO INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS - CÂMPUS DE BOTUCATU.

Aos 22 dias do mês de agosto do ano de 2025, às 14h, por meio de Videoconferência, realizou-se a defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de VICTÓRIA D'AMARIO GAVIOLI, intitulada **Desenvolvimento de dispositivo microfluídico para biópsia líquida de células tumorais circulantes**. A Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes membros: Prof. Dr. VALBER DE ALBUQUERQUE PEDROSA (Orientador(a) - Participação Virtual) do(a) Departamento de Química e Bioquímica / Instituto de Biociências de Botucatu Unesp, Prof. Dr. GUSTAVO ROCHA DE CASTRO (Participação Virtual) do(a) Departamento de Ciências Químicas e Biológicas / Instituto de Biociências de Botucatu - Unesp, Profa. Dra. ESTELA DE OLIVEIRA LIMA (Participação Virtual) do(a) Departamento de Clínica Médica / Faculdade de Medicina de Botucatu - Unesp. Após a exposição pela mestranda e arguição pelos membros da Comissão Examinadora que participaram do ato, de forma presencial e/ou virtual, a discente recebeu o conceito final: APROVADO. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelo(a) Presidente(a) da Comissão Examinadora.


Prof. Dr. VALBER DE ALBUQUERQUE PEDROSA

REGISTRO DA CONTEXTUALIZAÇÃO BIOTECNOLÓGICA E SOCIAL

O avanço das biotecnologias voltadas a área da saúde tem possibilitado avanços significativos no diagnóstico e tratamento do câncer, ao possibilitar a criação de dispositivos miniaturizados, sensíveis e de baixo custo, como os dispositivos microfluídicos. Eles consistem em uma ferramenta multifuncional que permite a manipulação de fluidos em escala micrométrica para análise de células e biomoléculas de alta precisão e reprodutibilidade. Tendo um potencial promissor na detecção de células tumorais circulantes (CTCs), que são biomarcadores fundamentais para o diagnóstico precoce, monitoramento terapêutico e prognóstico de diversos tipos de câncer.

Enquanto as tecnologias convencionais de identificação de CTCs, como biópsias sólidas, ainda apresentam limitações quanto à sensibilidade, custo e invasividade. Os dispositivos microfluídicos funcionalizados com biomoléculas específicas, como o anticorpo anti-EpCAM, oferecem uma alternativa mais acessível, rápida e com menor risco ao paciente. A combinação da tecnologia de captura por afinidade biológica com processos de litografia macia permite a fabricação de chips com alta especificidade, reduzindo o número de etapas e equipamentos necessários para a análise.

Do ponto de vista social, o câncer continua sendo uma das principais causas de morte no mundo, com impacto mais significativo em países em desenvolvimento, onde o acesso a exames de rastreamento e métodos diagnósticos avançados é limitado. A implementação de soluções eficientes e de baixo custo, como os dispositivos microfluídicos, pode contribuir para a democratização do diagnóstico oncológico, favorecendo sua descentralização e integrando-se a redes públicas de saúde. Permitindo a ampliação do acesso à medicina de precisão e detecção precoce em populações mais vulneráveis.

Ao desenvolver um dispositivo capaz de isolar CTCs com base em afinidade molecular, esta pesquisa se insere em um contexto de inovação tecnológica com impacto direto na sociedade, promovendo não apenas avanços científicos, mas também respostas concretas a desafios estruturais da saúde pública.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer ao meu orientador, Prof. Dr. Valber de Albuquerque Pedrosa, por todos esses anos de orientação. Foi um prazer trilhar toda minha jornada acadêmica guiada pelo senhor. À Prof.^a Dra. Adriana Camargo Ferrasi, pelo fornecimento das amostras, explicações e ideias para o projeto. À doutoranda Amanda Fantini de Camargo Andrade, pela ajuda e ensinamentos sobre cultura celular que foram fundamentais para realização desse trabalho.

Aos meus pais, Patricia e Fabio, que me apoiaram, incentivaram e estiveram ao meu lado em todos os momentos. Mesmo à distância me deram forças e energias para continuar vivendo o sonho. Obrigada por sempre me lembrarem do que sou capaz, vocês estão por traz de cada conquista minha, não teria conseguido sem vocês. À minha irmã Barbara, por estar do meu lado desde o primeiro dia, sempre me descontraindo, apoiando e mostrando o que realmente importa na nossa jornada.

À República Mash, que foi minha família por tantos anos: agradeço às que vieram antes de mim por terem criado nossa casa, às que entraram comigo por me mostrarem o verdadeiro significado de companheirismo e às que entraram depois de mim por darem continuidade a essa família. Obrigada por segurarem na minha mão e nunca me deixarem cair, foi um prazer ter tido a companhia de cada uma de vocês nessa trajetória.

À Julia, que entrou nessa jornada comigo, desde a graduação até o mestrado, é uma honra compartilhar tantas vivências dentro e fora da academia ao seu lado. À Camila, que mesmo longe está sempre presente, me encorajando a enfrentar cada desafio. Tenho muito orgulho de tudo que nós três conquistamos. À Isabela, que está comigo desde a época da escola, apoiando todas minhas ideias e me lembrando dos meus valores, obrigada por tantos anos ao seu lado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, pelo apoio financeiro a este projeto.

RESUMO

A biópsia líquida representa uma abordagem inovadora e minimamente invasiva para a detecção e monitoramento do câncer, permitindo a análise de células tumorais circulantes (CTCs) a partir de fluidos biológicos. Diante das limitações dos métodos convencionais de biópsia, que envolvem procedimentos invasivos, alto custo e dificuldade de repetição, o presente trabalho propôs o desenvolvimento de um dispositivo microfluídico funcionalizado com anticorpo anti-EpCAM, capaz de isolar e capturar CTCs de forma: eficiente, seletiva e viável para estudos posteriores. A produção do dispositivo envolveu a criação de moldes em placas de silício por fotolitografia e a replicação dos microcanais em PDMS utilizando litografia macia. O processo demonstrou alta reprodutibilidade, integridade estrutural e baixo custo. O dispositivo foi funcionalizado com avidina e anticorpo biotinilado anti-EpCAM, conferindo especificidade à captura de células tumorais que expressam EpCAM. Ensaios de fluxo revelaram que o aumento da velocidade de injeção proporcionou maior taxa de captura celular, com melhores resultados observados em dispositivos funcionalizados, evidenciando a relevância do EpCAM como marcador de seleção. A linhagem celular utilizada é do MCF-7 (câncer de mama), assim como as expansões da cultura celular primária do glioblastoma e meningioma, todas EpCAM-positivas, além da CCRF-CEM como controle negativo. As culturas primárias de glioblastoma e meningioma foram obtidas a partir de amostras cirúrgicas e expandidas com sucesso, sem contaminações, reforçando a viabilidade do modelo experimental. O dispositivo demonstrou não apenas alta eficiência de captura e pureza, mas também a capacidade de liberação das células após o isolamento, preservando sua viabilidade e possibilitando análises posteriores, como sequenciamento e estudos funcionais em célula única. Além dos testes *in vitro*, o dispositivo foi aplicado em amostras clínicas de pacientes com tumores do sistema nervoso central, evidenciando sua aplicabilidade prática ao capturar quantidades significativas de CTCs. Os resultados obtidos indicam que o dispositivo é uma ferramenta promissora para o diagnóstico, monitoramento e compreensão da heterogeneidade tumoral. Assim, o sistema microfluídico desenvolvido apresenta um avanço na tecnologia de biópsia líquida para cânceres do sistema nervoso central e outros tipos tumorais. Sua combinação de simplicidade estrutural, baixo custo e eficiência funcional mostra um potencial para análises posteriores podendo contribuir significativamente para o diagnóstico precoce e o acompanhamento da evolução tumoral.

Palavras-chave: células tumorais circulantes, dispositivo microfluídico, EpCAM, glioblastoma, meningioma, biópsia líquida, medicina personalizada.

ABSTRACT

Liquid biopsy represents an innovative and minimally invasive approach to cancer detection and monitoring, enabling the analysis of circulating tumor biomarkers, such as circulating tumor cells (CTCs), directly from biological fluids. Given the limitations of conventional biopsy methods, which often involve invasive procedures, high costs, and limited repeatability, this study proposed the development and validation of a microfluidic device functionalized with an anti-EpCAM antibody, capable of isolating and capturing CTCs efficiently, selectively, and viably for further analysis. Device fabrication involved creating molds on silicon wafers via photolithography and replicating the microchannel architecture on PDMS using soft lithography. The process showed high reproducibility, structural integrity, and cost-effectiveness. Functionalization with avidin and a biotinylated anti-EpCAM antibody provided specificity for tumor cell capture. Flow experiments revealed that increasing injection speed led to higher capture rates, with significantly improved performance in functionalized devices, underscoring the importance of EpCAM as a selection marker. The cell line used is MCF-7 (breast cancer), as well as primary cell culture expansions of glioblastoma and meningioma, all EpCAM-positive, in addition to CCRF-CEM as a negative control. Primary cultures of glioblastoma and meningioma were successfully obtained from surgical samples and expanded without contamination, confirming the experimental model's viability. The device demonstrated not only high capture efficiency and purity but also the ability to release viable cells post-capture, enabling further downstream analyses such as sequencing and single-cell functional assays. In addition to in vitro validations, the device was evaluated on clinical samples from patients with central nervous system tumors, proving its practical applicability by capturing a promising number of CTCs. These results indicate that the proposed device is a valuable tool for tumor diagnosis, monitoring, and the investigation of tumor heterogeneity. Thus, the developed microfluidic system represents a significant advancement in liquid biopsy technology, particularly for central nervous system cancers and other tumor types. Its combination of structural simplicity, low cost, and functional efficiency supports its potential for clinical translation and contributes meaningfully to early diagnosis and personalized cancer care.

Keywords: circulating tumor cells, microfluidic device, EpCAM, glioblastoma, meningioma, liquid biopsy, personalized medicine.

LISTA DE IMAGENS

Figura 1 – Caminhos que a proto-oncogene pode tomar durante a transformação do oncogene	12
Figura 2 – Distribuição espacial das taxas brutas de incidência por 100 mil habitantes, estimadas para 2023	15
Figura 3 – Frequência dos grupos histológicos de câncer do SNC	17
Figura 4 – Passo a passo do processo de metástase do câncer (EMT: transição epitelial para mesenquimal, CAF: fibroblasto associado ao câncer, TAM: associado ao tumor macrófago)	23
Figura 5 – Tipos de separação de células específicas por microfiltração	31
Figura 6 – Ilustração de como o molde no <i>wafer</i> de silício foi fabricado	35
Figura 7 – Procedimento de funcionalização e passagem das células no dispositivo microfluídico	39
Figura 8 – Molde do dispositivo: <i>wafer</i> de silício com as ranhuras na placa de petri	43
Figura 9 – Arranjo geométrico do dispositivo microfluídico	44
Figura 10 - Ilustração do canal principal com as serpentinas funcionalizadas com o anticorpo.....	44
Figura 11 – Microscopia eletrônica de varredura do dispositivo microfluídico	45
Figura 12 – Imagens do dispositivo microfluídico	45
Figura 13 – Crescimento da cultura celular primária do glioblastoma A) 1º dia; B) 3º dia; C) 10º dia; D) 17º dia	46
Figura 14 – Crescimento da cultura celular do meningioma A) 1º dia; B) 3º dia; C) 6º dia; D) 15º dia	48
Figura 15 – Células MCF-7 com A) em baixa densidade; B) em alta densidade	49
Figura 16 – Distribuição da captura de células MCF-7 em relação ao tamanho do filtro A) com anticorpo; B) sem anticorpo	50
Figura 17 – Eficiência de captura das células MCF-7, de acordo com a taxa de fluxo para a condição de revestimento do anticorpo e sem o revestimento	51
Figura 18 – Captura de células alvo em diferentes velocidades A) Pureza; B) Eficiência.....	52
Figura 19 – Curva de calibração com concentrações entre 100–1600 células MCF-7	53

Figura 20 - O crescimento das células ao decorrer dos dias após serem liberadas	54
Figura 21 – Micrografia de amostra do paciente 1 com glioblastoma A) filtro positivo; B) filtro negativo	55
Figura 22 – Micrografia de amostra do paciente 2 com glioblastoma A) filtro positivo; B) filtro negativo	56
Figura 23 – Micrografia de amostra do paciente com meningioma A) filtro negativo; B) filtro positivo	57

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
1.1	CÂNCER.....	12
1.1.1	GLIOBLASTOMA	17
1.1.2	MENINGIOMA	19
1.2	CÉLULAS TUMORAIS CIRCULANTES	20
1.3	MÉTODOS TRADICIONAIS DE DETECÇÃO	24
1.4	DISPOSITIVO MICROFLUÍDICO	25
1.4.1	SEPARAÇÃO FÍSICA	30
1.3.2	SEPARAÇÃO BIOLÓGICA.....	32
2	OBJETIVO	35
3	METODOLOGIA.....	35
3.1	PRODUÇÃO DO MICRODISPOSITIVO	35
3.2	CULTURA CELULAR.....	37
3.2.1	CULTURA CELULAR PRIMÁRIA.....	37
3.2.2	CULTURA DAS CÉLULAS DE CONTROLE	37
3.2.3	PREPARAÇÃO DAS CÉLULAS PARA OS EXPERIMENTOS	38
3.3	FUNCIONALIZAÇÃO.....	39
3.4	FLUXO.....	40
3.5	TESTE DE EFICIÊNCIA DE CAPTURA	40
3.6	LIBERAÇÃO DAS CÉLULAS	41
3.7	TESTE COM AMOSTRA CLÍNICAS.....	41
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
4.1	PRODUÇÃO DO MICRODISPOSITIVO	43
4.2	CULTURA CELULAR.....	45
4.2.1	GLIOBLASTOMA	45

4.2.2	MENINGIOMA	47
4.2.3	MCF-7	48
4.3	FLUXO.....	49
4.4	TESTE DE EFICIÊNCIA DE CAPTURA	51
4.5	LIBERAÇÃO DAS CÉLULAS.....	53
4.6	TESTE COM A AMOSTRA CLÍNICAS.....	54
4.6.1	GLIOBLASTOMA	55
4.6.2	MENINGIOMA	56
5	CONCLUSÃO.....	58
6	REFERÊNCIA	60

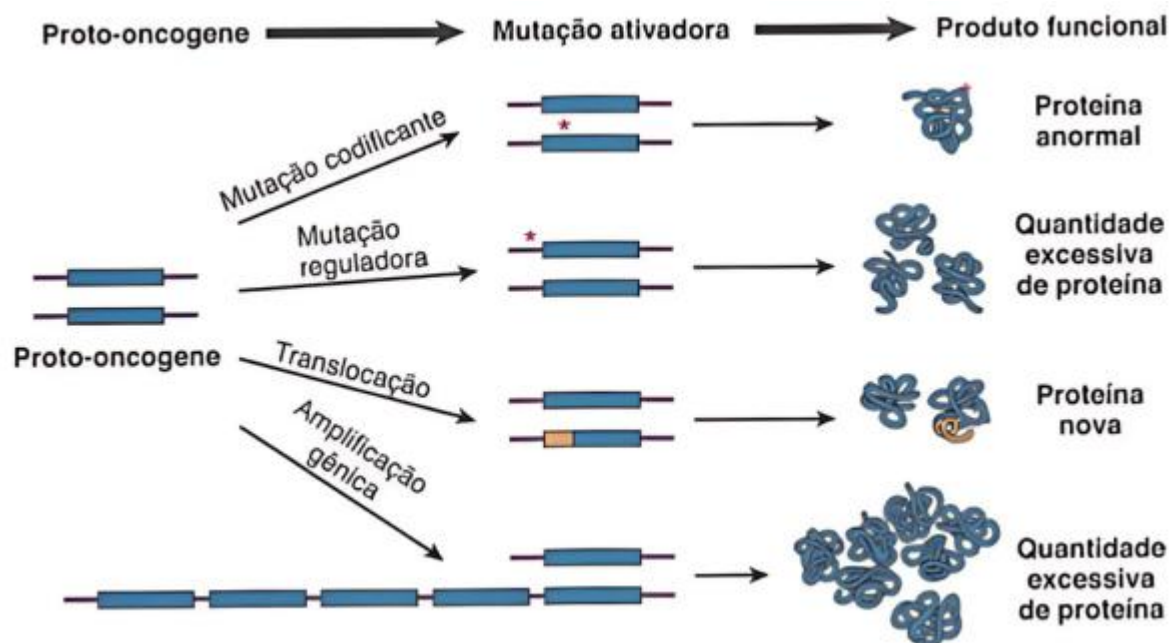
1 INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER

Câncer é uma doença caracterizada pelo crescimento desordenado de células, que se dividem rapidamente e se agrupam formando tumores. Esses tumores podem se espalhar para outras partes do corpo, gerando metástases. Tal processo é desencadeado por mutações genéticas que alteram a estrutura genética das células, levando à proliferação de células anormais [1].

As alterações ocorrem em genes especiais chamados de proto-oncogenes, que apesar de normais, influenciam a proliferação celular. Eles são ativados ao sofrerem qualquer mutação, até mesmo a alteração em um alelo pode ativá-los atuando de forma dominante, dando origem a um oncogene que pode apresentar vários caminhos, como ilustrado na **Figura 1**, como ganho de função ou hiperexpressão de RNAs e/ou proteínas, além da amplificação gênica, que gera superabundância RNAm codificado e do produto proteico [2].

Figura 1 - Caminhos que a proto-oncogene pode tomar durante a transformação do oncogene



Fonte: Thompson, 2016

Esses genes, conhecidos como genes estimuladores, induzem ou estimulam a proliferação celular, favorecendo o surgimento de uma neoplasia. No entanto, uma mutação oncogênica isolada não é suficiente para desencadear um estado canceroso. Para que isso ocorra, múltiplos genes reguladores do crescimento celular precisam ser alterados, resultando

na superação dos efeitos individuais e na desregulação dos mecanismos de controle celular, promovendo, assim, o desenvolvimento do câncer [3].

Existe também proteínas envolvidas no controle negativo do ciclo celular, codificadas pelos genes supressores tumorais (GST), essas mutações se manifestam pela falta de ação, inibindo ou prevenindo a expressão do fenótipo maligno, agindo de forma recessiva onde ambos os alelos são perdidos, mas ainda assim sendo mais frequentemente mutados na maior parte das neoplasias humanas, exceto os cânceres de linhagem hematológica [4].

A carcinogênese, ou oncogênese, é um processo determinado pela exposição a agentes cancerígenos, levando em consideração sua frequência, duração e interação. Esse processo é dividido em três estágios [5]:

- Estágio de iniciação: as células se encontram geneticamente alteradas, ainda sem formação tumoral detectável, elas apenas se encontram iniciadas;
- Estágio de promoção as células iniciadas, sob a influência de oncopromotores, passam por um processo gradual de transformação em células malignas. Esse processo é lento e requer exposição prolongada e contínua ao agente promotor. promovendo a transformação de células iniciadas em malignas;
- Estágio de progressão: é caracterizada pela multiplicação descontrolada e irreversível das células alteradas, o câncer já está instalado e evoluindo. Os fatores que promovem a iniciação e progressão são chamados de oncoaceleradores ou carcinógenos.

Existem diversos fatores que podem causar o câncer sendo externas ou internas. As causas externas estão relacionadas ao meio ambiente, aos hábitos e ao estilo de vida. Estima-se que aproximadamente 80% dos casos de câncer estejam associados a fatores ambientais, os quais podem influenciar o desenvolvimento de diferentes tipos da doença [6].

Dentre os fatores externos, destacam-se os cancerígenos físicos, como a exposição à radiação ultravioleta e ionizante; os cancerígenos químicos, que incluem substâncias como amianto, componentes do tabaco, aflatoxinas e arsênio; e os cancerígenos biológicos, que envolvem infecções causadas por determinados vírus, bactérias e parasitas [6].

Outro fator importante é a hereditariedade, isso é quando mutações ocorrem em células germinativas (óvulo e espermatozoides), sendo transmitidas de pai/mãe para filhos, com o desenvolvimento do embrião a variante patogênica é replicada em todas as células do corpo

incluindo as células germinativas do feto, foram identificadas mais de 50 síndromes hereditárias, pessoas com essa síndrome têm um risco significativamente maior de desenvolver certos tipos de câncer em relação a população em geral [7].

Cerca de 5 a 10% de todos os casos no Brasil estão associados a fatores hereditários, alguns dos tipos mais frequentes são: câncer no intestino, sarcomas e câncer de mama [8]. Embora não se possa afastar a hipótese de exposição dos membros da família a uma causa comum. Além disso, determinados grupos étnicos parecem apresentar diferentes susceptibilidades a certos tipos de câncer, como a baixa incidência de leucemia linfocítica em orientais e a raridade do sarcoma de Ewing em indivíduos negros [9].

Independentemente da origem genética ou ambiental do câncer, o tratamento adequado para cada tipo de tumor é determinado através de um diagnóstico preciso. As principais abordagens terapêuticas incluem cirurgia, radioterapia e quimioterapia. Alguns tipos de câncer quando detectados precocemente, apresentam altas taxas de cura assim que diagnosticados e tratados corretamente, enquanto cânceres mais agressivos e disseminados exigem estratégias terapêuticas mais intensivas. Em casos avançados ou de recidiva, os cuidados paliativos tornam-se fundamentais para garantir a qualidade de vida do paciente [9].

Para o planejamento e gestão na área oncológica, estimativas são realizadas periodicamente, fornecendo informações fundamentais para políticas públicas. Para isso, foram estabelecidos 21 localizações primárias ou grupos de localização, sendo eles: cavidade oral; esôfago; estômago; cólon e reto; fígado; pâncreas; laringe; traqueia, brônquio e pulmão; melanoma maligno da pele; outras neoplasias malignas de pele; mama feminina; colo de útero; corpo do útero; ovário; próstata; bexiga; sistema nervoso central; glândula tireoide; linfoma de Hodgkin; linfoma não Hodgkin e leucemias [10].

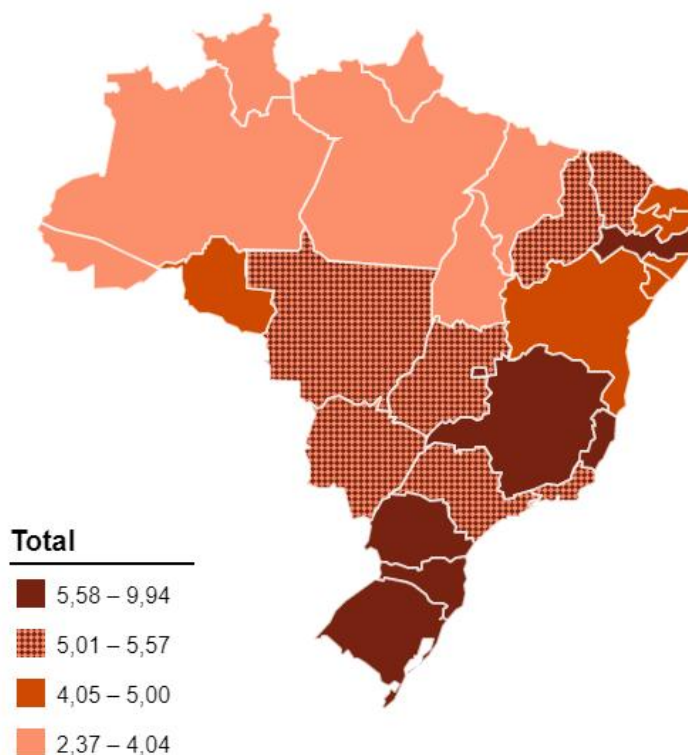
Com base nas classificações estabelecidas, o Instituto Nacional de Câncer (INCA) estima cerca de 704 mil novos casos para o triênio 2023-2025. A maior concentração das incidências, cerca de 70%, ocorre nas regiões Sul e Sudeste. Entre os diversos tipos de neoplasias, o câncer de pele não melanoma se destaca como o tumor maligno mais frequente no país, independentemente do sexo [11].

No sexo masculino, o câncer de próstata é o tumor mais prevalente em todas as regiões do Brasil. Em seguida, observa-se uma variação conforme o Índice de Desenvolvimento Humano (IDH) da região: nas áreas com maior IDH, os tumores colorretais ocupam a segunda posição, enquanto nas regiões com menor IDH, essa posição é ocupada pelo câncer de

estômago. No sexo feminino, o câncer de mama é o mais incidente, seguido pelo câncer colorretal nas regiões de maior IDH e pelo câncer de colo do útero nas áreas de menor IDH [11].

Quando se considera uma localização primária específica, como o sistema nervoso central, a estimativa nacional aponta para 11.490 novos casos anuais, com uma taxa ajustada de incidência de 4,33 casos por 100 mil habitantes. A maior incidência é observada na região Sudeste, seguida pelas regiões Nordeste, Sul, Centro-Oeste e Norte, conforme ilustrado na **Figura 2**. Globalmente, os tumores do sistema nervoso central representam aproximadamente 1,4% a 1,8% de todas as neoplasias malignas [10].

Figura 2 - Distribuição espacial das taxas brutas de incidência por 100 mil habitantes, estimadas para 2023



Fonte: Instituto Nacional de Câncer, 2022.

Os tumores do sistema nervoso central (SNC) compreendem um heterogêneo de mais de 50 entidades que se diferem em localização, morfologia, biologia molecular e comportamento clínico. Graças a isso a Organização Mundial de Saúde (OMS) estabeleceu uma classificação baseada nas suas características, classificando sua taxonomia, nomenclatura (incluindo de genes e proteínas) e grau de agressividade [12].

O grau do tumor se baseia em suas características de crescimento e agressividade. Sendo assim, os tumores do SNC são classificados em quatro graus, conforme o padrão de crescimento observado ao microscópio: os tumores de baixo grau (1 e 2) tendem a crescer mais lentamente e são menos agressivos; enquanto os de alto grau (3 e 4) são mais rápidos e agressivos [13].

Tumores que foram confirmados apenas por exame de imagem não podem ter seu gradiente determinado, e os que não tem seu gradiente documentados ou não aplicados são considerados incompletos [14]. Certos tipos de tumores podem apresentar mais de um grau, mesmo que seja mais comum estarem vinculados a um grau específico. Isso ocorre devido à dependência e individualidade de cada caso. Por exemplo, o meningioma pode se apresentar em três graus diferentes, mas a maior parte dos casos está no grau 1. Já o glioblastoma aparece exclusivamente no grau 4, embora existam diversos tipos de gliomas em outros graus.

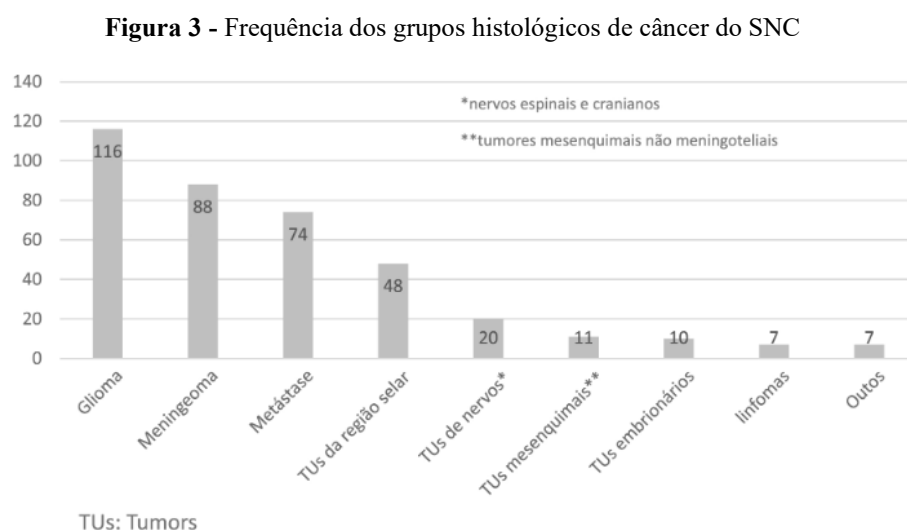
Um dos principais desafios associados aos tumores do SNC está relacionado à presença de três barreiras fisiológicas: a barreira hematoencefálica (BHE), que atua como interface entre o cérebro e a circulação sanguínea; a barreira hematoquímica (BHL), localizada no plexo coróide; e a barreira hematoencefálica, presente no epitélio aracnoide. Essas estruturas são essenciais para o controle e a regulação da homeostase do cérebro, da medula espinhal e do líquido cefalorraquidiano em relação ao restante do organismo [15].

A BHE representa um obstáculo significativo para terapias contra tumores do SNC devido à sua composição altamente seletiva, formada por células endoteliais especializadas, não frestradas, em contato com periquitos e astrócitos, ligados entre si por junções aderentes, comunicantes, proteínas de suporte e junções oclusivas [16]. As funções da BHE são divididas em três subgrupos: barreira física, metabólica e de transporte. Em conjunto, esses mecanismos garantem a homeostase do microambiente neural e a proteção contra substâncias neurotóxicas e patógenos [17].

Um aspecto de grande relevância é compreender como as células tumorais circulantes (CTCs) conseguem, em circunstâncias específicas, transpor a BHE. A maioria das CTCs que interagem com essa barreira não sobrevive ou permanece restrita ao microambiente perivascular. O fato de apenas uma fração muito pequena dessas células conseguir estabelecer metástases sugere que as CTCs capazes de detectar, aderir e atravessar a BHE com sucesso possuem mecanismos adaptativos específicos que favorecem essa sequência de eventos. Entre

eles, destaca-se o papel das integrinas, que podem mediar interações indiretas com plaquetas e leucócitos, facilitando a adesão ao endotélio e subsequente extravasamento [18].

Esses dois tumores citados são os mais recorrentes em relação aos tumores do sistema nervoso central (SNC). Na **Figura 3**, é possível observar que, em um período de quatro anos, foram registrados 116 casos de gliomas, dos quais 66 eram glioblastomas, e 88 casos de meningiomas. Este estudo foi realizado no Hospital da Santa Casa de São Paulo, permitindo analisar as incidências e características patológicas [19].



Fonte: Maffei, et al, 2021

1.1.1 GLIOBLASTOMA

O termo gliomas refere-se a tumores que, em geral, se originam nas células da glia e correspondem a aproximadamente 3 a cada 10 tumores cerebrais [13]. Segundo a classificação da OMS de 2021, os gliomas não são mais classificados apenas por graus, mas também com base em características histológicas e moleculares, o que permite melhor compreensão da natureza e o prognóstico de cada entidade [12].

No caso de adultos, são categorizados principalmente como: Astrocitoma, IDH-mutante, que podem ser apresentados em grau 1, 2 ou 3; Oligodendroglioma, IDH-mutante com deleção 1p/19q, classificados como grau 2 ou 3; e Glioblastoma, IDH-selvagem, de grau 4, representando o subtipo de pior prognóstico. Além desses, existem os gliomas pediátricos e os gliomas circunscritos, que não se infiltram no parênquima cerebral da mesma forma que os gliomas difusos. Esses tumores incluem: Astrocitoma pilocítico; Xantoastrocitoma

pleomórfico, sendo de grau 2 ou 3; Ganglioglioma; e Astrocitoma subependimário de células gigantes (SEGA) [12].

O glioblastoma é o tipo maligno mais comum, representando 14,2% de todos os tumores. Ele corresponde a mais da metade dos cânceres primários malignos do SNC, com 50,9% dos tumores malignos, e possui um prognóstico de sobrevida média de 15 a 24 meses [20]. Anteriormente, segundo a classificação da OMS de 2016, existiam tumores astrocíticos difusos IDH-mutantes (podendo ser o astrocitoma difuso, o astrocitoma anaplásico e o glioblastoma), que era considerados glioblastomas secundário devido à progressão de algum outro glioma. No entanto, a OMS de 2021 englobou todos esses tumores em Astrocitoma, IDH-mutante, deixando a classificação do glioblastoma apenas como IDH-selvagem [21].

O glioblastoma do tipo IDH-selvagem, ou seja, IDH mutante, é caracterizado por diferenciação astrocítica, atipia nuclear, pleomorfismo celular, atividade mitótica e apresentar um padrão de crescimento difuso assim como proliferação e/ou necrose microvascular [21].

É possível determinar seu diagnóstico apenas com marcadores celulares, sem a necessidade de achados histológicos de alto grau ou exames de imagem. Os marcadores celulares podem incluir a mutação do promotor da *telomerase reverse transcriptase* (TERT), ampliação do gene *epidermal growth factor receptor* (EGFR), deleção homozigótica de *CDKN24* e *CDKN2B* ou ganho do cromossomo 7 e perda do cromossomo 10 [22].

Em relação às ampliações gênicas, detectam-se os genes *EGFR*, *PDGFRA* e *MET* que codificam *RTKs* mitogênicos, dependendo de genes ciclina-quinases *CDK4* e *CDK6*, que atuam como mediadores da transição da fase G1 para S do ciclo celular, e *MDM2* e *MDM4* que codificam as proteínas que inibem a atividade de p53 [23].

O tumor pode surgir em indivíduos de qualquer faixa etária, porém manifestam-se com mais frequência em pacientes acima de 50 anos de idade, com maior incidência na sétima década de vida. Eles ocorrem mais frequentemente em pacientes do gênero masculino, tem rápida evolução clínica e apresentam topografia principal na parte frontal. Sendo considerados primários, isto é, surgem sem um glioma de baixo grau preexistente [23].

O tratamento pode incluir cirurgia, quimioterapia, terapia alvo e algumas técnicas como radioterapia convencional (RT), radioterapia conformada ou tridimensional (RT3D) e a mais recomendada por agir de forma focal no cérebro, radioterapia com modulação da intensidade do feixe (IMRT) [24].

1.1.2 MENINGIOMA

O meningioma é o tumor mais comum do SNC, representando 41,7% de todos os tumores. Caracteriza-se pelo crescimento lento, ser majoritariamente não maligno (56,8%) e pode ser curado com total remissão. No entanto, pode ocorrer a recorrência local e/ou progressão para um tumor de grau mais alto com invasão celular [25].

A classe dos meningiomas abrange 15 subcategorias baseadas em suas características histopatológicas e moleculares. Nos últimos anos essas características foram associadas com mutações recorrentes, fenótipos clínico-patológico, localização do tumor e prognóstico [25]. No entanto, independentemente desses subtipos, a classificação de seu grau continua a mesma, podendo ser [13]:

- Grau 1: tumores benignos, responsáveis por 80% dos casos, onde suas células se assemelham às células normais;
- Grau 2: tumores atípicos ou invasivos, suas células têm características um pouco mais anormais, podem aparecer diretamente no tecido cerebral ou próximo, e apresentam maior risco de recidiva;
- Grau 3: tumores anaplásicos ou malignos, é o tipo mais raro, suas células são anormais e crescem rapidamente, no tecido cerebral ou próximo e tem maior probabilidade recidivar pós o tratamento, podendo até se espalhar para outras partes do corpo.

Os meningiomas ocorrem predominantemente em mulheres em todos os seus graus, sendo mais frequentes após os 50 anos. Nos graus 1 e 2, sua principal localização é no extra axial frontal, enquanto os meningiomas de grau 3, ocorrem na parte frontal [19]. Além disso, representam 40,2% dos tumores da medula espinhal e ocorrem em indivíduos a partir dos 20 anos [14].

Diversos biomarcadores moleculares estão associados à classificação e aos graus dos meningiomas, incluindo *SMARCE1* (subtipo de células claras) para os tumores da medula espinhal, *BAP1* (subtipos rabdoide e papilar) característico do tipo rabdoide, e mutações nos genes *KLF4*, *NF2*, *PIK3CA*, *TRAF7*, *SMO* e *AKT1* (subtipo secretor) na base do crânio. A mutação do promotor *TERT* e/ou de deleção homozigótica de *CDKN2A/B* (em casos do grau III), além da perda de expressão nuclear de *H3K27me3* (com potencial prognóstico pior) e do perfil de metiloma (subtipagem prognóstica) [12]/ [25].

O tratamento mais utilizado é a cirurgia, mas dependendo do grau e localização é necessário o uso de radioterapia [13]. Algumas terapias-alvo também são utilizadas, como o uso de inibidores de *CDK4/6* para meningiomas de alto grau e inibidores de adesão focal em meningiomas com mutações em *NF2* [25].

1.2 CÉLULAS TUMORAIS CIRCULANTES

Para um diagnóstico acurado e consequentemente um tratamento oncológico adequado é necessária análise histopatológica dos tumores, a forma mais convencional envolve a obtenção de amostras tumorais de forma invasiva de amostras tumorais, através da ressecção de tecidos do tumor primário e/ou metástases. Esse estudo avalia os aspectos anatomopatológicos e imunohistoquímica estimativas prognósticas e planejamento terapêutico mais adequado [26].

Esse procedimento pode ser realizado através de cirurgias abertas, laparoscópica ou robótica, ou com a utilização de agulhas guiadas por exames de imagem, como a tomografia computadorizada ou ultrassonografia. Porém, o procedimento demonstra limitações, como a coleta de amostra insuficiente e examinar apenas um ou algumas regiões podendo resultar em ausência de informações e causar complicações inerentes, esses pontos tornam inviável a repetição de coleta repetidamente impossibilitando o acompanhamento de alterações moleculares [26].

Com isso, a biópsia líquida (BL) surge como uma excelente ferramenta para suprir as limitações da biópsia convencional, ela consiste na coleta de um tecido biológico não sólido, podendo ser saliva, urina, líquido cefalorraquidiano, ou o mais utilizado, o sangue periférico [27]. Pelo fato dessa técnica necessitar apenas da coleta de uma amostra do líquido biológico torna-se relativamente mais confortável ao paciente por ser menos invasiva minimizando complicações e tendo baixo custo [28].

Outro aspecto que tem despertado a atenção da comunidade científica é a possibilidade de informações úteis para a medicina de precisão, devido a caracterização molecular dos tumores, sendo utilizada para determinar tratamentos específicos e personalizados, permitindo o planejamento terapêutico individual [29].

Portanto, algumas das vantagens são: coleta rápida, barata e menos invasiva; avaliação constante da evolução do tumor; possíveis múltiplas coletas; permite o acesso a informações

sobre diversas características tumorais; possibilita tratamento personalizado e avaliação da resposta terapêutica; avaliação de doença residual mínima e tempo de remissão, e avaliação da heterogeneidade tumoral, por fornecer biomarcadores de múltiplos sítios [30].

Porém todas as técnicas, em seu início, apresentam desvantagens e algumas da BL que podem ser citadas são: grande variabilidade de metodologia e falta de padronização entre métodos; biomarcadores de difícil acesso e detecção na circulação, sendo necessário um volume maior de amostra e técnicas mais avançadas; os resultados devem ser interpretados de forma individual entre diferentes tumores, e tende a ser mais úteis em estágios mais avançados [30].

Alguns componentes derivados do tumor que são frequentemente analisados na biópsia líquida são as células tumorais circulantes (CTCs), DNA tumoral circulantes (ctDNA), fração circulante de RNA (cfRNA) e exossomos [31].

O ctDNA refere-se à fração circulante de DNA (cfDNA) proveniente de células tumorais, tanto as mortas quanto as vivas. O aumento do ctDNA pode ser relacionado com o tamanho do tumor, mesmo com sensibilidade limitada devido à sua meia-vida curta e liberação variável. O ctDNA pode auxiliar no diagnóstico, monitorar tumores e resposta ao tratamento. Em estudos de glioma e tumores metastáticos revelam a metilação de MGMT, mutações em IDH1 e perfis de metilação que discriminam tumores intracranianos [32].

Os exossomos contêm proteínas, RNAm, microRNAs (miRNA) e DNA com as mesmas mutações de tumor de origem. Eles possuem proteínas como GFAP e TAU que ajudam a diferenciar pacientes com glioblastoma multiforme com alta precisão, mRNAs como EGFRvIII apresentam precisão de até 85% e os miRNA-320 e miRNA-574-3p também auxiliam na especificidade e sensibilidade superiores a 85% [32].

As CTCs em gliomas compartilham mutações com os tumores de origem, usando marcadores como proteína glial fibrilar ácida (GFAP), elas oferecem oportunidade para estudos de transcriptômica em células vivas oferecendo informações valiosas sobre progressão do tumor e sua agressividade. Os métodos mais utilizados para análise dessas células incluem: isolamento por densidade, lise de eritrócitos, sistemas microfluídicos, imunocoloração e hibridização *in situ* fluorescentes (FISH) [32].

As células tumorais circulantes podem ser apresentadas morfológicamente nas amostras como células únicas ou aglomerados de células que são denominadas clusters de CTCs, eliminadas na corrente sanguínea a partir de lesões primárias e metastáticas [27]

Além delas proporcionarem novas perspectivas para testes de drogas *in vitro* e *in vivo*, através da obtenção de culturas de CTC, permite o monitoramento de padrões dinâmicos de suscetibilidade tumoral a medicamentos, onde modelos derivados de pacientes podem ser usados para identificar novos alvos terapêuticos e revelar as bases moleculares de resposta ou resistência de tratamentos [33].

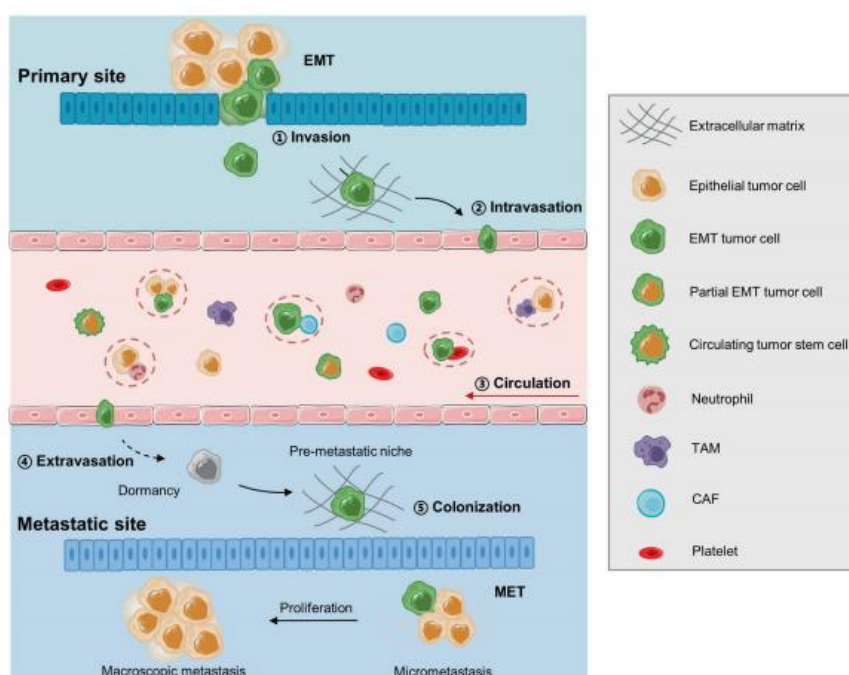
Apesar de todas as suas vantagens, como o uso de tecnologias bem avaliadas e de fácil reprodutibilidade, a correlação com o perfil mutacional e a heterogeneidade tumoral, além da possibilidade de realização de ensaios funcionais como morfológicos, genômicos, transcriptômicos e proteômicos, ainda existem desvantagens na análise. Entre elas estão a baixa concentração no sangue, especialmente em fases iniciais, a fragilidade na circulação e a alta heterogeneidade, o que pode levar a resultados falso-negativos [30].

Como mencionado, as CTCs são extremamente raras, com apenas 1 a 10 células presentes em cada mililitro de sangue periférico, que contém cerca de 500 milhões de células normais. Por isso, isolá-las e detectá-las em meio a essa mistura complexa e heterogênea representa um grande desafio. [34].

O ciclo de formação e disseminação de CTCs é fundamental para a progressão do câncer e a formação de metástases em locais distintos do corpo, para isso acontecer é necessário uma série de passos são ilustrados na **Figura 4** e serão descritos a seguir.

Figura 4 - Passo a passo do processo de metástase do câncer. EMT: transição epitelial para mesenquimal,

CAF: fibroblasto associado ao câncer, TAM: associado ao tumor macrófago



Fonte: Lin, et al., 2021

O primeiro passo desse processo acontece com a formação do próprio tumor primário onde ocorre o desenvolvimento de um tumor sólido em que as células proliferam descontroladamente; em seguida acontece a ativação da transição epitelial-mesenquimal (EMT) que consiste nas células tumorais sofrerem uma mudança fenotípica as tornando mais móveis e invasivas, é aqui que elas perdem as características epiteliais e adquirem propriedades mesenquimais que irão facilitar a desagregação do tumor [35].

Logo após, ocorre o processo de desagregação e invasão celular tumoral onde as células tumorais invadem tecidos adjacentes sob condições específicas, como hipoxia, que acaba ativando o fator HIF1 α promovendo adesão às células endoteliais por meio de moléculas como CXCR4 e L1CAM. Essas células podem invadir ativamente ou serem expelidas passivamente devido à instabilidade vascular dos tumores que tem as matrizes extracelular degradadas permitindo a passagem [36].

A intravasação é quando as células tumorais invadem os vasos sanguíneos, processo que foi facilitado pela hipóxia, entrando na corrente sanguínea. Nesse processo ocorre o aumento de permeabilidade endotelial, via VEGFA, e alterações no metabolismo das células tumorais, como a ativação de fatores de transições epitelial-mesenquimal e de crescimento [36].

O transporte na corrente sanguínea acontece quando as células tumorais circulantes surgem de forma concreta. A sobrevivência no ambiente circulatório é muito desafiadora, mesmo que milhões de CTCs entrem no sangue menos de 0,01% sobrevivem, isso acontece devido ao ambiente hostil da corrente sanguínea que contém condições adversas como estresse de cisalhamento e ataques do sistema imunológico. Mesmo assim, algumas delas conseguem escapar da vigilância imunológica e se adaptar ao meio, a formação de clusters e a interação com plaquetas e neutrófilos auxiliam na proteção e sobrevivência no meio [35].

Aquelas CTCs que conseguem sobreviver extravasam, isso é, saem da corrente sanguínea e vão para novos tecidos. Esse processo pode ocorrer através do aprisionamento mecânico em capilares pequenos ou por adesão ativa às paredes endoteliais. Moléculas como mucinas (MUC1), integrinas, e mediadores inflamatórios (CXCL12) facilitam a migração transendotelial [36].

Por fim, a colonização do sítio metastático acontece depois da extravasação, as células tumorais disseminadas (DTCs) chegam a nichos metastáticos e podem entrar em estado de dormência ou de proliferação, a determinação do estado depende do microambiente local e

estímulos inflamatórios. Fatores anatômicos e biológicos, como conexões vasculares diretas e quimiotaxia (via CXCR4) influenciam na escolha do local [36].

As células tumorais circulantes (CTCs) têm a capacidade de disseminar tanto a partir do tumor primário quanto de lesões metastáticas. Esse processo pode resultar na formação de novas metástases, caracterizando a disseminação metástase-para-metástase, ou no retorno ao sítio tumoral primário, fenômeno conhecido como autosssemeadura tumoral [36].

1.3 MÉTODOS TRADICIONAIS DE DETECÇÃO

Alguns métodos mais tradicionais para análise de biópsia líquida e CTCs são: ELISA [37], FISH [38], PCR digital [39], CellSearch™ [40] e microfluídica [41]. Mesmo que alguns métodos não analisem diretamente a CTC é possível analisar proteínas, exossomos e ctDNA que fornecem informações igualmente importantes para o prognóstico do câncer.

O ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) é uma técnica altamente sensível e específica para analisar biomoléculas em amostras biológicas. Ela utiliza a ligação específica entre antígenos e anticorpos junto com a ajuda de enzimas conjugadas e reagentes, resultando um sinal detectável e quantificável [42].

Essa técnica pode ocorrer de forma direta onde o antígeno é imobilizado diretamente na placa, e um anticorpo primário conjugado com enzima se liga ao antígeno para detecção [43]; de forma indireta utiliza-se um anticorpo primário específico para o antígeno e um anticorpo secundário conjugado à enzima que se liga ao anticorpo primário [44]; de forma sanduíche usa dois anticorpos para capturar e detectar o antígeno [45]; e da forma competitiva onde testa a presença de anticorpos ou antígenos na amostra, com base na competição por ligação ao antígeno ligado à placa [43].

Essa técnica é comumente utilizada para análise de exossomos [46], vesículas extracelulares [47] e proteínas tumorais circulantes [48] que geram uma grande gama de informações importantes, porém pode vir a analisar algum fator das CTCs [49].

O FISH (Fluorescence In Situ Hybridization) é uma técnica molecular que utiliza sondas de DNA ou RNA marcadas com fluorocromos para identificar e localizar sequências específicas de ácidos nucleicos, permitindo sua visualização em um microscópio de epifluorescência. As sondas podem ser marcadas de forma direta, com fluorocromos conjugados diretamente à sonda (mais rápido e prático), ou de forma indireta, utilizando

moléculas como digoxigenina, ligada a anticorpos conjugados a fluorocromos ou por amplificação enzimática [38].

Esse método já é bastante utilizado em pesquisas relacionadas às CTCs, estudando amplificações como HER2 [50], rearranjos como ALK [51], métodos de enriquecimento por subtração (SE-FISH) [52] [53] e método de enriquecimento negativo (NE-FISH) [54] [55].

A reação em cadeia da polimerase digital (PCR digital) é uma técnica de amplificação de ácidos nucleicos que a amostra é dividida em milhares a milhões de pequenas partições de forma aleatória, e a amplificação ocorre de forma isolada [56]. Após a amplificação cada partição é classificada como positiva/1 (presença do alvo) ou negativa/0 (ausência do alvo), a quantidade absoluta é calculada por meio de estatística de Poisson [57]. Essa avaliação é realizada através da fluorescência, onde o número de fluorescência brilhante é igual ao das moléculas de DNA/RNA alvo [58].

O PCR digital é utilizado para detectar mutações específicas no DNA e RNA [59], além da identificação de mutações no cfDNA que são importantes para o monitoramento e resistência do tratamento [60] [61], podendo fornecer também um perfil de uma CTC isolada [39].

O sistema CellSearch é uma plataforma aprovada pela U.S. Food and Drug Administration (FDA) para detecção e enumeração em pacientes com câncer [40]. Ele foi projetado para enriquecimento imunomagnético, marcação fluorescente e detecção de células, para isso são produzidos e comercializados diversos kits de funcionalização celular [62].

Esse sistema apresenta bons resultados na quantificação de CTCs na maioria de tipos de câncer, tendo destaque tanto no estágio metastático de câncer de mama, próstata, pulmão [63], cabeça e pescoço [64] como em estados mais precoces [65].

1.4 DISPOSITIVO MICROFLUÍDICO

Desde a década de 1990 os dispositivos microfluídicos vêm ganhando espaço e despertado grande interesse no mundo científico devido à redução no tamanho, peso e consumo de energia. Essas características, associadas à maior sensibilidade e à produção em larga escala e com baixo custo tornaram essa tecnologia altamente atrativa para diversas aplicações. Eles manipulam pequenas quantidades de amostra e vêm se destacando nos campos médicos, biológicos e químicos, demonstrando um enorme potencial para reduzir custos de fabricação,

consumo de reagentes e tempo de análise, além de aumentar a portabilidade e eficiência dos equipamentos [66] [67] [68] [69].

A microfluídica é definido como a ciência e tecnologia de sistemas que processam ou manipulam pequenas quantidades de fluidos, entre 10^{-9} e 10^{-18} L, em canais com dimensões que variam de dezenas a centenas de micrômetros [68]. Essa ciência surgiu a partir da convergência de diversas áreas como química, física, biologia, ciência dos materiais, dinâmica dos fluidos e microeletrônica [70].

Eles podem ser classificados como passivos, que são aqueles dispositivos que dependem apenas de sua geometria, e como ativos, que englobam aqueles dispositivos que integram sensores ou detectores capazes de transduzir mudanças químicas, biológicas ou físicas. Ambos os tipos são amplamente utilizados em diversas aplicações biomédicas e químicas [71].

Algumas das aplicações biomédicas mais estudadas podem ser divididas em seis áreas principais, sendo elas: detecção de doenças, descoberta de medicamentos, modelagem de doenças, engenharia de tecidos, no uso de órgãos-em-chip e como biossensores microfluídicos. Todas essas áreas apresentam um espectro de subáreas que vem sendo exploradas [71].

O uso do dispositivo para diagnóstico de doenças tem diversas aplicações, como a detecção de câncer, a modelagem de mecanismos como apoptose, a análise de tratamentos de câncer resistentes a medicamentos [72], combinação terapêutica [73], acompanhamento de novas terapias [74] e isolamento de biomarcadores como CTCs [75], exossomos [76] e cfDNA [77].

Para o sistema da descoberta e liberação de medicamentos os sistemas microfluídicos tem um papel crucial, pois oferecem controle preciso, alta eficiência e potencial para terapias personalizadas. Eles permitem o controle e testes de sistema de entrega de medicamentos [78], de sistemas sensíveis a estímulos [79], aprimoração de produção de partículas [80] e da verificação de complexos fármaco-polímero [81]. Além da descoberta e avaliação de medicamentos e detecção de biomarcadores [82] e no desenvolvimento de nanopartículas guiadas, com potencial para aplicações em estratégias de medicina personalizada e terapia gênica [83].

As modelagens de doenças são essenciais para entender a fisiopatologia das doenças humanas e desenvolver terapias avançadas, plataformas *tumor-on-chip* e *organ-on-chip* estão

em crescente uso na modelagem de câncer [84], doenças neurológicas como Alzheimer e Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA) [85], pulmonares [86] e hepáticas [87].

Na engenharia de tecidos, o dispositivo oferece um ambiente controlado para investigar interação célula-célula, facilitando o transporte de nutrientes e remoção de resíduos por meio de sistemas de microperfusão [88]. Esses dispositivos permitem replicar aspectos-chave de tecidos naturais, como fluxo intersticial, diferenciação celular e influência de fatores mecânicos e bioquímicos [89], além de permitirem a produção de nanopartículas e microfibras [90].

O uso dos dispositivos como plataformas Organ-on-a-Chip (OoC) permite substituir os modelos de cultura celular bidimensional e os modelos animais, devido a preocupações éticas e à incapacidade destes últimos de reproduzir adequadamente a fisiopatologia humana [91]. Na última década, os sistemas OoC têm sido amplamente utilizados para simular o microambiente fisiológico de diversos órgãos, incluindo intestino [92], coração [93], fígado [94], ossos [95], rins [96], pulmões [97] e cérebro [98].

Por fim, os biossensores microfluídicos oferecem a análise rápida de moléculas biológicas em pequenas quantidades, utilizando o mínimo de reagentes e gerando poucos subprodutos [71]. Eles são classificados em quatro categorias, conforme o elemento biológico utilizado: biossensores baseados em enzimas [99], nanoenzimas [100], anticorpos [101] e ácidos nucleicos [102].

A seleção dos materiais de fabricação dos microdispositivos é essencial, pois influencia diretamente o desempenho e a compatibilidade do dispositivo e suas aplicações. Os fatores mais importantes incluem a durabilidade, transparência óptica, resistência química, biocompatibilidade de superfícies, tolerância térmica e de pressão, além do potencial para funcionalização de superfície. Os materiais comumente utilizados são metais, silício, vidro, cerâmicas, polímeros, hidrogéis e papel, cada um apresentando vantagens e limitações específicas [103].

Os metais são duráveis, resistentes ao calor e quimicamente robustos, sendo ideais para síntese de nanopartículas. No entanto, apresentam limitações como limitante o peso e à opacidade óptica [103]. O silício é versátil, termicamente estável e possui alta transparência e resistência química, sendo processado por gravação e processamento mecânico, porém é incompatível com imagens ópticas devido a opacidade [104].

O vidro apresenta alta transparência óptica, resistência química e excelente biocompatibilidade. Os microcanais podem ser formados por processos químicos e mecânicos, como gravação úmida ou seca e corte mecânico, embora a fabricação possa ser custosa. Já os polímeros são flexíveis e econômicos, mas com baixa transparência e resistência mecânica, sendo adequados para aplicações ópticas e biológicas utilizados principalmente em litografia suave, sendo o polidimetilsiloxano (PDMS) o mais comum [104].

Os materiais termoplásticos são caracterizados por alta transparência e resistência mecânica, podendo ser fabricados por métodos como estampagem a quente, ablação a laser e impressão 3D. A resina fotossensível, amplamente utilizada na litografia suave e impressão 3D, oferece alta resistência química, mas pode afetar o comportamento celular devido a componentes não reagidos durante a polimerização [104].

Os hidrogéis têm baixa resistência mecânica, mas são altamente biocompatíveis e ideais para cultura celular 3D, sendo utilizados em processos de litografia, impressão 3D e moldes sacrificiais. No entanto, são estruturalmente frágeis e de difícil manutenção. O papel, embora tenha baixa resistência mecânica, é utilizado em dispositivos microfluídicos, embora apresente desafios devido à sua propriedade hidrofílica. Por fim, a cerâmica é estável termicamente, com química superficial única, mas é limitada pela fragilidade e pela dificuldade de integração em microssistemas [103].

Os métodos de fabricação de moldes ou matrizes são organizados em técnica de fabricação de baixo e alto volume. Os processos de baixo volume geralmente são realizados de forma seriada, incluindo processos como fundição, fabricação laminada, fabricação a laser e impressão 3D. Já os processos de alto volume desempenham um papel relevante na produção comercial de dispositivos microfluídicos, abrangendo métodos de estampagem a quente, microinjeção e técnicas baseadas em filmes e folhas [105].

As técnicas de microfabricação podem ser amplamente classificadas em três tipos: baseadas em fotolitografia, replicação e xerografia. A técnica baseada em fotolitografia consiste no uso de luz para definir características em um material fotodefinível. O material fotorresistente SU-8 é usado para o desenvolvimento de microestruturas de grande altura, variando de 100 μm de largura até 2 mm de altura, sem a necessidade de instalações complexas de raios X [106].

Alguns métodos utilizados para a fabricação de dispositivos microfluídicos com fotorresistentes incluem o uso de material de sacrifício, onde um material fotorresistente é revestido por centrifugação e padronizado para formar microcanais abertos. Um material de sacrifício preenche esses canais, seguido por uma segunda camada de fotorresistente, que define

os furos de acesso. A dissolução do material de sacrifício cria microcanais fechados [107]; Outro método é laminação de filme seco, onde um filme SU-8 ou Kapton é laminado sobre microcanais abertos para formar a estrutura completa [108]; Além disso, a exposição a comprimentos de onda diferentes utiliza duas exposições UV (365 nm e 254 nm) para criar microcanais no fotorresistente SU-8. A primeira exposição define as paredes laterais, enquanto a segunda cria a camada de encapsulamento [109].

Alternativamente, a estereolitografia que é um processo aditivo que utiliza resinas líquidas e luz para criar microestruturas 3D, sendo ideal para prototipagem [110]. Por outro lado, a ablação a laser que é um processo subtrativo que remove materiais por evaporação, para formar microcanais, especialmente em polímeros termoendurecíveis [111].

Os métodos baseados em replicação são populares por oferecerem baixo custo e alta produtividade na fabricação de dispositivos microfluídicos em polímeros. Esses processos dependem de moldes, que podem ser fabricados por meio de técnicas como fotolitografia, gravação em silício, LIGA (lithographie galvanofomung abformung), ablação a laser ou micro-EDM (usinagem por descarga elétrica em escala micrométrica) [106].

A litografia macia é uma técnica de baixo custo e alta precisão de replicação (até 10nm), onde um componente elastômero é misturado com um agente de cura e desgaseificação para evitar bolhas. Após a cura, o molde é removido e a estrutura é colada em uma lâmina de vidro ou folhas de polímero para gerar microcanais [112].

A estampagem a quente é uma técnica empregada para criar microestruturas em polímeros termoplásticos. Nesse processo, o material é aquecido acima de sua temperatura de transição vítrea, transferindo as microestruturas para o polímero [113]. A estampagem por injeção é um processo eficaz para a produção em alto volume, no qual o polímero é aquecido, derretido e injetado em um molde, onde é resfriado para formar uma réplica. Apesar dos ciclos rápidos de moldagem, esse processo apresenta desafios, como a formação de bolhas, tempo de resfriamento e controle de parâmetros como pressão e temperatura [114].

Por fim, o processo baseado em xerografia é uma técnica utilizada para criar microestruturas em filmes multicamadas. Nesse método, as camadas são cortadas individualmente, homologadas e laminadas usando adesivos sensíveis à pressão (PSAs) para formar o dispositivo final. Essa técnica permite integrar materiais baratos, como cloreto de polivinila (PVC) e tereftalato de polietileno (PET), além de fabricar rapidamente e realizar processos simples [113].

Além das técnicas de produção, a separação das CTCs (células tumorais circulantes) também é de grande importância. Devido às diferenças nas características biofísicas e

bioquímicas das CTCs, é possível dividir os métodos de captura em dois grupos principais: aqueles baseados em propriedades físicas e os baseados em propriedades biológicas. Esses métodos aproveitam as distinções entre as CTCs e outras células sanguíneas [115].

1.4.1 SEPARAÇÃO FÍSICA

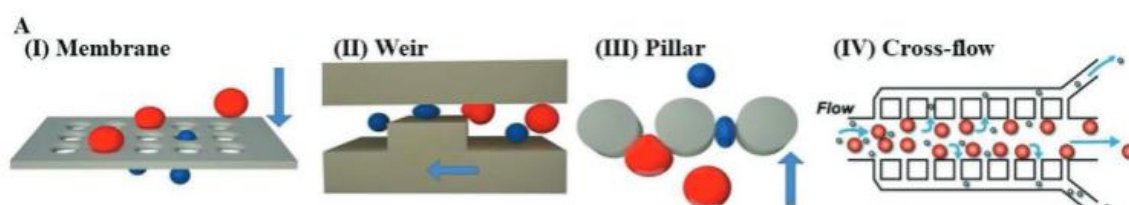
A separação física para o isolamento de CTCs pode levar em consideração diversas propriedades físicas das células, tais como tamanho, densidade, adesão, deformidade, propriedades dielétricas, acústicas, suscetibilidade magnética e propriedades hidrodinâmicas [116].

Os métodos mais discutidos na literatura focam principalmente na diferença de tamanho, onde as CTCs têm uma média de 15 a 25 μm [117], enquanto as células sanguíneas variam de 7-8,5 μm para eritrócitos e de 5-13 μm para leucócitos [118]. Além disso, destaca-se a diferença nas propriedades dielétricas, com as CTCs apresentando carga negativa mais intensa [119], enquanto os outros tipos de células apresentam diferença significativa na capacitância da membrana celular [120].

1.3.1.1 MICROFILTRAÇÃO

A microfiltração é uma técnica passiva que não requer forças externas, tendo como critério o tamanho e deformação da célula. Existem quatro geometrias principais de isolamento, conforme ilustrado na **Figura 5**, filtros com poros que é uma matriz 2D de orifícios para capturar células-alvo [121]; represas (weir), onde um microcanal é projetado para atuar como barreira na direção do fluxo [122]; postes (pillar), que formam uma matriz de micropostes com intervalos específicos [123]; e fluxo cruzado (cross-flow) onde o fluxo é perpendicular à estrutura de represa ou à matrix de micropostes [124].

Figura 5 - Tipos de separação de células específicas por microfiltração



Fonte: Nasiri, et al., 2020

Dois parâmetros que influenciam no design dessas estruturas são a taxa de fluxo e o espaçamento transversal das construções, cuja combinação deles define o tamanho crítico e a

deformidade das células alvo [125]. Um de seus principais problemas é a alta tendência de entupimento e à possível obstrução do dispositivo, além da sensibilidade limitada para células pequenas e necessidade de maior automação [126].

1.3.1.2 HIDRODINÂMICA

Métodos de separação baseados em forças hidrodinâmicas aplicam menor estresse fluídico sobre as células tumorais circulantes em comparação ao método de microfiltração, uma vez que elas não passam por nenhuma barreira física. Além das amostras serem processadas em altas taxas de fluxo, proporcionando elevada vazão e recuperação das células para possíveis análises consequentes [127].

Dentre as estratégias promissoras está o deslocamento lateral determinístico (DLD), que explora o fluxo laminar característico para a separação celular. Para isso uma matriz periódica de obstáculos é usada para separação, cada fileira têm uma determinada distância. Como as matrizes não estão na mesma direção do fluxo ele produz linhas de correntes curvas, com base no tamanho e espaçamento dos postes e nos deslocamentos entre as fileiras, define-se um diâmetro crítico onde as partículas menores são separadas, enquanto as maiores são desviadas e forçadas a se mover lateralmente, alcançando uma classificação CTC contínua [128].

O fracionamento por fluxo comprimido (PFF) é outro método que utiliza fluxo laminar para separação de partículas de acordo com seu tamanho. O dispositivo tem dois canais de entrada, geralmente em T, um canal contém a amostra e o outro o fluxo de buffer ambos convergem em uma região estreita onde o buffer empurra as partículas para a parede do canal. A posição lateral das partículas depende de seu centro de massa, quando o fluxo entra em uma região mais ampla do canal, a diferença nas posições das partículas é ampliada, permitindo sua separação em diferentes saídas [129].

Outra abordagem é a inercial, utilizada para ordenar células com base em seu tamanho em posições de equilíbrio, resultantes das forças de sustentação decorrentes da curvatura do perfil de velocidade e da interação da célula com a parede do canal. Isso promove em uma ordenação lateral de células de acordo com o tamanho da partícula, número de Reynolds [130].

1.3.1.3 DIELETROFORESE (DEP)

É um método ativo de separação que utiliza propriedades eletrofísicas de CTCs para isolá-los num campo elétrico não uniforme. Uma tensão de corrente alternada é aplicada em dois eletrodos de tamanhos diferentes, e a distribuição não uniforme das cargas gera uma força

DEP líquida que moverá as células em direção à região de maior gradiente do campo elétrico (DEP positiva) ou na direção oposta (DEP negativa), dependendo da condutividade elétrica da célula e do meio [131].

A manipulação de partículas pode ser feita em lote, quando as partículas são capturadas pelo DEP positivo nos eletrodos, enquanto as partículas sujeitas à DEP negativa são repelidas e se movem livremente. Ao desligar a voltagem aplicada as partículas capturadas são liberadas e podem seguir o fluxo, gerando um baixo rendimento de separação [132]. Por outro lado, a separação contínua é aplicada em dispositivos com eletrodos angulados para direcionar a partícula para uma saída garantindo uma separação mais eficiente [133].

1.3.2 SEPARAÇÃO BIOLÓGICA

Para o isolamento das células tumorais circulantes com base em propriedades biológicas, existem dois métodos principais: o imunomagnetismo e a afinidade de superfície. Ambos os métodos podem fazer a seleção positiva, isolando a CTC como célula alvo, ou por seleção negativa, na qual outras células do sangue são marcadas como alvo. Para os dois métodos os biomarcadores mais utilizados para CTCs são o EpCAM, DAPI, CK19, HER2, FICT, ASGPR1 e MUC1 e para as outras é bastante utilizado o CD45 e o DAPI [134] [135] [136].

1.3.2.1 IMUNOMAGNETISMO

A separação imunomagnética é uma combinação de propriedades magnéticas aplicadas às células com antígeno-anticorpo. Pode ser realizada por seleção positiva, onde as células alvas são as CTCs, e a seleção negativa onde atingem os leucócitos. Portanto, é necessário um processo de marcação adequada para atingir a sensibilidade e especificidade desejada, fornecendo um maior rendimento [127].

O campo magnético pode ser gerado por ímãs permanentes ou eletroímãs integrados ao chip, sua escolha depende de vários fatores relacionados a custo, eficiência, gradiente do campo eletromagnético [137]. A separação das células pode ocorrer em dois modos: o por lote e o contínuo [138].

No modo lote as partículas magnéticas são retiradas em uma câmara pelo campo magnético, após lavar as partículas não-alvo, o campo é desligado para liberar as partículas-alvo podendo gerar a perda de algumas delas [139]. Já o modo de fluxo contínuo, as partículas

não magnéticas seguem em linha reta enquanto as partículas magnéticas desviam lateralmente entrando em diferentes saídas baseado em sua suscetibilidade magnética [140].

1.3.2.2 AFINIDADE

O método de afinidade por superfície consiste em uma caracterização do dispositivo através da modificação da superfície com anticorpos correspondentes ao antígeno específico expresso pela CTC possibilitando uma alta sensibilidade para uma determinada célula e preservando a viabilidade celular [41]. Essa metodologia é frequentemente aplicada em dispositivos que apresentam padrões geométricos que auxiliam no isolamento das células [127].

As moléculas de adesão de células epiteliais (EpCAM) é frequentemente superexpressa em cânceres sólidos de origem epitelial, mas ausentes nas células sanguíneas, sendo um marcador amplamente utilizado para identificação de CTCs [141].

O EpCAM é uma proteína de membrana composta por três domínios principais: EpEX (extracelular), o EpICD (intracelular) e o TM (transmembrana), sua molécula imatura tem 314 aminoácidos, incluindo um peptídeo sinal que é clivado durante a maturação [142]. O domínio transmembrana é uma hélice altamente conservada, rica em valina e pobre em leucina, quando as subunidades das hélices são orientadas em cis ocorre um aumento de estabilidade [143].

Sendo considerada uma transmembrana glicoproteica do tipo I que é expressa na membrana basolateral da maioria das células epiteliais [144]. O EpCAM é uma molécula de adesão celular intracelular e hemofílica que ajudam na manutenção da integridade epitelial [145]. Além de servir como uma molécula de sinalização, após a clivagem na membrana celular, o domínio intracelular serve como cofator transcricional e regula a transcrição de genes alvos [146].

Apesar do EpCAM ter mostrado um futuro promissor no monitoramento de CTCs em amostras de sangue arterial e venoso, assim como em valores prognósticos [147], ainda existem desafios e desvantagens. As estratégias convencionais eram restritas a CTCs EpCAM-positivas, excluindo subgrupos de CTCs derivados da modificação EMT. Isso resulta em uma subestimação do número total de CTCs na circulação [148].

Isso porque quando elas se tornam EMT a expressão das proteínas epiteliais (de superfície) é regulada negativamente, portanto, certas populações podem ser perdidas se a seleção for conduzida com base apenas em EpCAM [149]. Embora ofereçam alta seletividade,

esses métodos estão sujeitos a perdas celulares devido à expressão heterogênea de antígenos ou à acessibilidade limitada de anticorpos à superfície celular [150].

Para contornar essa situação e aumentar a sensibilidade alguns métodos de isolamento podem ser aplicados juntos com o EpCAM, como a aplicação de diferentes antígenos específicos de câncer usando imunodeteção. Alguns desses métodos exigem fixação, enquanto outros, como o método MAINTRAC®, não necessitam [151]. Outro método independente de antígenos, utilizado para capturar CTCs em relação aos leucócitos, é o Isolation by Size of Epithelial Tumor Cells (ISET®), que se baseia em diferenças físicas [152].

Por exemplo, o método de afinidade biológica depende de marcadores exógenos, que frequentemente afetam a atividade celular das CTCs, enquanto o método de triagem física tem baixa precisão de separação e pode produzir resultados falso-positivos. Portanto, os pesquisadores tentaram combinar os dois métodos, esse processo envolve a remoção eficaz dos leucócitos usando um método sem marcação, seguida pela captura seletiva das CTCs com alta eficiência e pureza utilizando um método baseado em afinidade [153]. Logo este projeto se focou no desenvolvimento de uma metodologia alternativas a biopsia tradicional para se detectar e quantificar células tumorais circulantes de uma forma rápida e menos onerosa para o sistema público de saúde seguindo os avanços da técnica até este momento.

2 OBJETIVO

O propósito desta pesquisa foi de criar uma metodologia para a captura e monitoramento de células tumorais circulantes (CTCs) utilizando sistemas microfluídicos modificados com anticorpos. Visando não apenas a contagem das CTCs, mas também o isolamento dessas células para futuras análises moleculares, como o sequenciamento genético.

Os objetivos específicos são:

- Desenvolvimento do sistema microfluídico;
- Funcionalização do microdispositivo e validação da metodologia;
- Cultura de células primárias;
- Detecção de células específicas;
- Análise em amostras de sangue de pacientes.

3 METODOLOGIA

3.1 PRODUÇÃO DO MICRODISPOSITIVO

O molde do microdispositivo consiste em um *wafer* de silício com microcanais que foram produzido pela técnica de fotolitografia ou litografia óptica, que utiliza luz ultravioleta (UV) para sensibilizar um resina fotorresistente onde as áreas irradiadas são removidas criando um perfil binário no substrato, a **Figura 6** demonstra a fabricação do molde.

Figura 6 - Ilustração de como o molde no *wafer* de silício foi fabricado



O dispositivo foi desenhado utilizando AutoCAD, o arquivo CAD foi enviado para uma empresa imprimir as transparências que serviram de fotomáscaras (CAD/Serviços Art, Inc. OR). Um *wafer* de silício foi embebido em acetona 99% durante 10 minutos, para remover as impurezas orgânicas, após esse período foi lavado com álcool isopropílico e água deionizada (DI), a superfície foi embebida em solução Piranha por 5 minutos, para remover quaisquer impurezas orgânicas ou inorgânicas.

O molde de silício foi lavado com água deionizada e secou-se num forno a 120° C durante 10 minutos e depois tratado com uma solução bis(trimetilsilil)amina (HMDS). Então uma fina camada de material foto sensitivo, SU8 2025, foi aplicada sobre o silício usando a técnica de revestimento por rotação, onde a espessura do material foi de cerca de 45 µm. Após esse processo o molde foi colocado numa placa de aquecimento a 85° C durante 90 minutos e então exposto à luz UV para formação das ranhuras via fotomáscara.

A exposição aos raios UV promovem uma polimerização do material fotorresistente exposto, SU8, fazendo com que o padrão da fotomáscara seja transferido para o *wafer*. Seguidamente a exposição o molde foi aquecido até 95°C durante 10 minutos e seco a temperatura ambiente. A espessura exata e características do molde preparado foram medidas utilizando um perfilômetro modelo Dektak 150.

O dispositivo microfluídico foi fabricado por litografia macia, técnica que utiliza fotogração dos microcanais em um polímero fotossensível e um substrato sólido. O PDMS em estado líquido (base/agente de cura = 10:1) foi homogeneizado e despejado no molde que foi colocado em uma placa de petri. Então ele foi colocado numa câmara de vácuo a -400 mmHg para a remoção de bolhas presentes no substrato. Após esta etapa, o molde contendo PDMS foi aquecido a 65°C durante pelo menos 4 horas, onde o PDMS foi polimerizado e formou um substrato elástico transparente.

Com o auxílio de uma lâmina, o substrato foi retirado do molde, cortado para encaixar sobre uma lâmina de microscópio e com uma caneta cortante inserida à 90° foram feitos furos para que fosse possível a entrada e saída de capilares nas extremidades, promovendo o fluxo do líquido. O chip e a lâmina foram lavados com álcool, secados com nitrogênio e tratados com ozônio durante 5 minutos para se unirem e selarem evitando vazamentos do líquido.

3.2 CULTURA CELULAR

Para obtenção das células utilizadas para validação do dispositivo foram empregados dois grupos de células. O primeiro consiste na cultura celular primária, onde foram extraídas células diretamente do tecido tumoral, e o segundo se baseia em células comercializadas que foram utilizadas para testes de eficiência e pureza.

3.2.1 CULTURA CELULAR PRIMÁRIA

Para o cultivo primário foram coletados no Hospital da Faculdade de Medicina de Botucatu, de acordo com o protocolo aprovado pela comissão de ética da instituição, dois tipos de tumores que expressam o EpCAM, o glioblastoma e meningioma, ambos os tecidos tumorais foram extraídos durante a cirurgia e colocados imediatamente no meio DMEM.

O tecido foi tratado, dentro de no máximo 6 horas depois da cirurgia, sendo lavado 3 vezes com PBS e depois colocado em uma placa petri onde foi iniciado o processo de extração celular física com o auxílio de um *cell scraper*. A superfície foi varrida e lavada com uma seringa de 10 ml contendo PBS, esse processo foi repetido por 10 vezes, para que haja o deslocamento total das células soltas. O sobrenadante contendo as células soltas foi coletado e centrifugado por 6 minutos a 2000 rpm, o sobrenadante foi descartado e o meio de cultura DMEM contendo 30% de SFB e 1% de antibiótico foi adicionado, após a homogeneização, as células foram plaqueadas e mantidas durante 48 horas em uma estufa 37°C contendo 5% de CO₂. Após esse período as células soltas foram retiradas e as células aderidas foram mantidas em DMEM com 10% de SFB em estufa úmida, com troca periódica do meio até atingirem a confluência de 90% e serem transmitidas para uma garrafa maior.

Para transferência, após a retirada do sobrenadante uma solução de Tripsina-EDTA (GIBCO, *Fisher Scientific*) foi adicionada, após a dispersão da camada celular dispersar o meio foi adicionado e pipetado cuidadosamente para uma garrafa de 75 cm², sendo mantidas novamente para a estufa até atingirem confluência de 90% e serem utilizadas nos experimentos.

3.2.2 CULTURA DAS CÉLULAS DE CONTROLE

Para realização de cálculo de eficiência de captura celular foi utilizado um tipo celular de câncer de mama, a MCF-7, que é uma expansão de células importadas do *American Type Culture Collection (ATCC)*, do Estados Unidos, e que expressa o EpCAM.

Ela estava armazenada em um galão de nitrogênio no departamento de Bioquímica-IBB-UNESP Botucatu, nele estavam armazenadas diversas subculturas congeladas, foi selecionada uma das primeiras subculturas para ser realizado a expansão.

O descongelamento foi realizado através da técnica de pincelamento em banho maria a 37°C, depois 1 ml foi adicionado em um tubo falcon de 15 ml com 3 ml do meio DMEM + 2mM de Glutamina + 100µg/ml de Insulina bovina +10% SFB, depois de homogeneizar ele foi centrifugado por 7 minutos à 2000rpm. O sobrenadante foi retirado e descartado, as células foram adicionadas em uma garrafa de 25 cm² com 5 ml do meio e levadas para a estufa a 37°C com 5% de CO₂.

A troca do meio foi realizado a cada 3 ou 4 dias, até que as células atingissem uma confluência de 90% e pudessem ser transferidas para uma garrafa maior. Para isso o sobrenadante era retirado e descartado, as células eram lavadas. Em seguida a solução Tripsina-EDTA (GIBCO, *Fisher Scientific*) foi adicionada, após observar a camada celular dispersar foi adicionado o meio e pipetado cuidadosamente para que a cultura fosse transportada para a garrafa de 75 cm², sendo mantidas novamente para a estufa até atingirem confluência de 90% e serem utilizadas nos experimentos.

As células controle utilizadas foi a CCRF-CEM, importadas do *American Type Culture Collection (ATCC)*, que por serem células de linfoblasto T humano não expressam EpCAM. Elas foram descongeladas em banho maria a 37°C, através da técnica de pincelamento, adicionadas em um falcon com o meio RPMI-640 com 10% de SFB + 10 mg de Estreptomicina + 100 U de penicilina e centrifugadas por 7 minutos 2000 rpm, o sobrenadante foi descartado e as células adicionadas numa garrafa de 75 cm² no meio citado, mantidas na estufa a 37°C com 5% de CO₂ onde foram mantidas até atingirem 90% de confluência.

3.2.3 PREPARAÇÃO DAS CÉLULAS PARA OS EXPERIMENTOS

A preparação das células MCF-7, a de glioblastoma e a de meningioma e CCRF-CEM foi realizada de forma diferente, já que as quatro primeiras células são do tipo aderentes e a última cresce no meio em suspensão. Ambas foram utilizadas nos testes de fluxo, eficiência de captura, pureza de captura e influência da funcionalização.

Para a utilização das células MCF-7, a de glioblastoma e a de meningioma primeiro foi necessário remover todo o meio de cultura e fazer uma lavagem com DPBS para que as

impurezas fossem removidas, a seguir foi adicionado 2 mL de Tripsina- EDTA concentrada em 0,25% e incubou-se por 10 minutos para o desprendimento das células das paredes da garrafa de cultura. Para uma neutralização 5 mL do meio de cultura foram adicionados e ocorreu a lavagem das células soltas duas vezes com DPBS removendo as impurezas finais e finalmente ressuspensando as células em 1mL de DPBS.

Foram contadas cerca de 1000 a 10000 células em 1 mL de DPBS que foram tingidas com azul de trypan 0,4% diluído em DPBS em 1 mL, ambos foram misturados até atingirem homogeneidade e deixados em um repouso de 5 minutos, tendo assim as células preparadas para passarem no dispositivo.

O caso das células CCRF-CEM por já estarem suspensas no meio de cultura, apenas foi necessário a dupla lavagem das células com DPBS para remoção de impurezas e depois ressuspender em 1 mL de DPBS.

3.3 FUNCIONALIZAÇÃO

A fim de o dispositivo ter afinidade de superfície é necessário passar uma sequência de princípios que irão aumentar a chance de captura celular. Para a realização da funcionalização foi utilizado a bomba de injeção *Chemyx Fusion 200 Modular Micro Syringe Pump*, como demonstrado na **Figura 7**, onde é possível selecionar a quantidade e o fluxo desejado e ele gera um fluxo dentro do chip.

Figura 7 - Procedimento de funcionalização e passagem das células no dispositivo microfluídico



Inicialmente o dispositivo foi lavado com 25 μ L de etanol 95% para evitar a formação de bolhas, em seguida, foi injetado 250 μ L de uma solução salina tamponada de fosfato (DPBS, *Fisher Scientific*, Hampton, NH) com finalidade de remover o excesso de etanol. Então foi injetado 75 μ L de avidina com concentração de 1 mg/ml, onde ficou incubado por 15 minutos, ela foi imobilizada no dispositivo por meio de absorção física, em seguida foi lavada com 200 μ L de DPBS para retirada de seu excesso.

Posteriormente uma solução de 70 μL de uma solução anti-EpCAM biotilado, com concentração de 10 $\mu\text{g/ml}$, foi introduzido no dispositivo e incubado por 15 minutos. O anti-EpCAM ligou se com a avidina por meio da reação bioquímica biotina-avidina. Por fim, passou um tampão contendo 1% de albumina de soro bovino (BSA) para impedir a captura de células sanguíneas não específicas.

3.4 FLUXO

Foram utilizadas as células MCF-7 como modelo de estudo de captura do microdispositivo e um teste crucial é a determinação da velocidade do fluxo para que aumente a eficiência de captura das células sem elas serem danificadas. Para isso, a bomba de injeção foi programada para que o fluxo de infusão das células fosse de 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0 $\mu\text{L/s}$, o teste foi feito em triplicata tanto para dispositivos funcionalizados com o anticorpo quanto os sem anticorpos, com isso além do fluxo foi possível observar a captura de células de acordo a distribuição espacial e a influência da funcionalização.

3.5 TESTE DE EFICIÊNCIA DE CAPTURA

A eficiência da captura de células é obtida através de uma razão do número de células que ficaram retidas no dispositivo pelo número de células que foram injetadas nele. Para isso foram considerados três modelos, como é observado na **Tabela 1**, um em que foi realizado em soluções tampão onde estava uma das células que expressam o anticorpo, MCF-7. O segundo modelo foi uma mistura de células, uma quantidade conhecida de MCF-7 com a CCRF-CEM que não expressa, simulando uma amostra de sangue. E o terceiro modelo foi utilizado uma matriz de sangue saudável, que não contém CTC, e foi adicionado um número conhecido de uma das células cancerígenas.

Para o primeiro modelo foi extraído uma amostra com aproximadamente 10000 células em solução tampão DPBS, foi injetada no dispositivo já funcionalizado, em seguida com 250 μL de DPBS para retirada das células não capturadas e por fim analisado no microscópio. No segundo modelo foi misturado a célula alvo com a não alvo na proporção de 1:20, onde também foi lavado com DPBS e analisado no microscópio. Nesse modelo além da eficiência também foi observado a pureza de captura que foi observado através da razão do número de células alvo capturadas pelo número de células capturadas no dispositivo. Por fim, no terceiro modelo foram adicionadas de 100-1600 células em cada experimento em 1 ml de sangue diluído em DPBS

(1:1) e então injetadas no dispositivo preparado, depois lavado com DPBS e então levado ao microscópio e feita a contagem de células.

Tabela 1 – Modelos experimentais utilizados para avaliação da eficiência e pureza de captura

Modelo	Amostra utilizada	Nº de células	Meio	Análise
1	MCF-7 em DPBS	~10.000 células	Tampão (DPBS)	Eficiência
2	MCF-7 + CCRF-CEM	1:20	Tampão (DPBS)	Eficiência e Pureza
3	Sangue saudável + MCF-7 adicionadas	100–1600 células	Sangue	Eficiência

Fonte: Elaborado pelo autor (2025)

3.6 LIBERAÇÃO DAS CÉLULAS

Para o estudo de liberação e viabilidade das células capturadas o seguinte procedimento. Consequente foi realizado: a captura das células, primeiro injetou-se 250 µL de uma solução tripsina-EDTA de 0,25% e aguardou-se um período de 10 minutos para a reação de desacoplamento das células retidas. Em seguida, passou uma infusão de 250 µL de DPBS para que as células livres fossem removidas do interior do microdispositivo. A viabilidade das células liberadas foi determinada por coloração com 4% de azul de Trypan (*Fisher Scientific*, NH) que foi homogeneizada na solução de PBS com meio DMEM e SFB, deixado em repouso em temperatura ambiente e depois analisado na câmara de Neubauer para contagem celular. Após esse processo as células liberadas foram recultivadas em uma placa de petri.

3.7 TESTE COM AMOSTRA CLÍNICAS

As amostras de sangue dos pacientes foram cedidas pela Prof^a. Dra. Adriana Camargo Ferrasi, que as coletou no Hospital da Faculdade de Medicina de Botucatu, de acordo com o protocolo aprovado pela comissão de ética da instituição, todas as amostras foram processadas dentro de um intervalo de quatro horas depois da coleta.

Antes a amostra chegar foi realizada a funcionalização do dispositivo como descrito na secção 3.3, cada amostra de sangue continha 5 ml, ele foi centrifugado por 4 minutos a 1200 rpm para que houvesse a separação do plasma, que foi descartado e o restante foi diluído em DPBS (1:1), totalizando uma amostra de ± 4m. Depois desse processamento a amostra foi passada pelo dispositivo através da bomba de infusão com a seleção do melhor fluxo

encontrado, em seguida ele foi lavado com 250 μ L de DPBS para que ocorra a remoção de células vermelhas e brancas que tenham ficados em seu interior. Logo após foi injetado 100 μ L de paraformaldeído (PFA) com concentração de 4%, ficando incubado por 10 minutos para promover a fixação das células, depois foi injetado 250 μ L de DPBS e posteriormente 250 μ L de solução Triton X-100 a 0,2%, sendo incubado por 10 minutos para ocorrer a permeabilização celular.

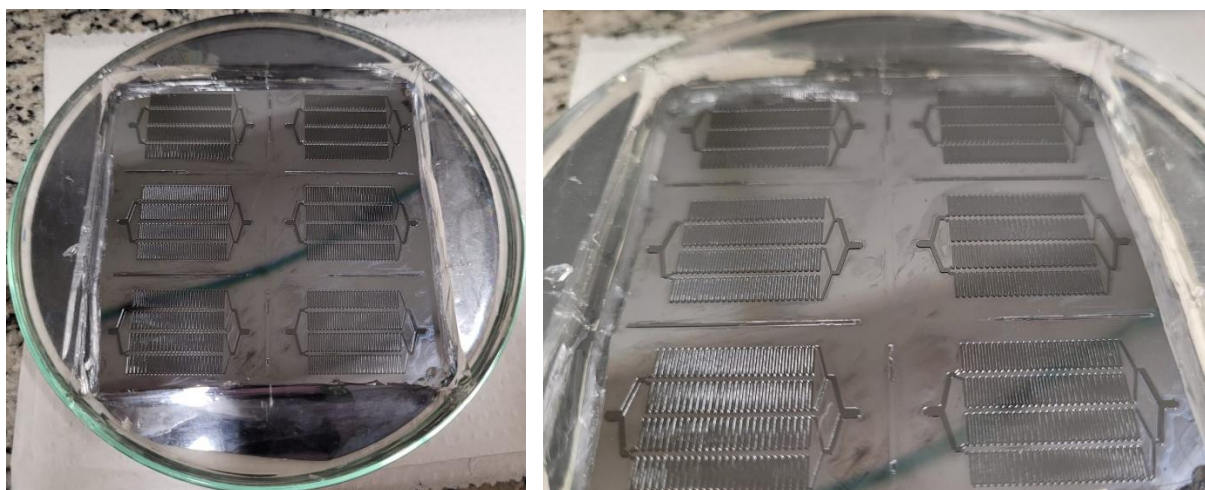
Por fim, ele foi lavado com 250 μ L de DPBS e foi introduzido um cocktail de corantes de fluorescência que era constituído de 60 μ L de 500 nM DAPI, 10 μ L de 10 μ g/mL de anti-citoqueratina-FITC e 10 μ L de 10 μ g/mL de anti-CD45-PE, eles foram incubados durante 25 minutos para que ocorresse a marcação das células. O dispositivo então foi lavado com 250 μ L de DPBS para retirada do excesso dos corantes podendo então ser analisado em um microscópio de fluorescência, microscópio Olympus IX71.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 PRODUÇÃO DO MICRODISPOSITIVO

Na **Figura 8**, é apresentado o molde pronto, a parte prateada é o *wafer* de silício contendo as ranhuras dos microcanais, permitindo a fabricação de seis dispositivos simultaneamente. O *wafer* também possui marcações indicando onde os cortes do dispositivo devem ser feitos para padronizar o produto, bem como os locais de entrada e saída dos capilares que devem ser perfurados. A parte envolvente é o PDMS polimerizado, que, apesar de não ser utilizado no dispositivo final, auxilia na modelagem ao delimitar o espaço e moderar o material.

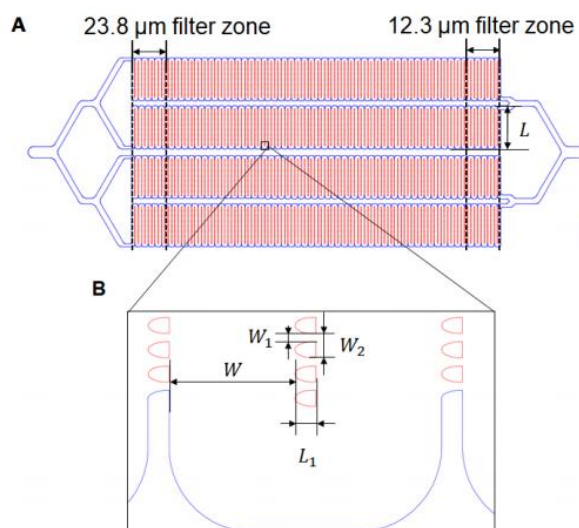
Figura 8 - Molde do dispositivo: *wafer* de silício com as ranhuras na placa de petri



Cada dispositivo microfluídico possui um conjunto de filtros composto por quatro colunas que contém os canais principais no formato de serpentina, além de uma sequência de filtros laterais incorporados. Esses filtros seguem um padrão geométrico, ilustrado na **Figura 9A**, no qual, a cada 10 colunas, ocorre um decréscimo de aproximadamente $1,15 \mu\text{m}$, resultando em 11 zonas de tamanhos diferentes e totalizando em 110 colunas de filtros. A zona com maior tamanho de filtragem está localizada na entrada do canal, com $23,8 \mu\text{m}$, enquanto a menor, de $12,3 \mu\text{m}$, está localizado na saída do dispositivo. À medida que os filtros diminuem de tamanho, o fluxo também se estreita, começando com quatro fluxos, que se unem em dois e, finalmente, saem em um único fluxo.

Agora, tratando-se da métrica ilustrada na **Figura 9B**: o comprimento de cada filtro, representado por $L1$, é de $50 \mu\text{m}$; a largura do canal, W , é de $300 \mu\text{m}$; o tamanho do filtro, $W1$, como já mencionado, varia de $12,3$ a $23,8 \mu\text{m}$; a distância entre os dois filtros laterais, $W2$, é de $58 \mu\text{m}$; e a profundidade do canal principal e dos filtros laterais é de $45 \mu\text{m}$.

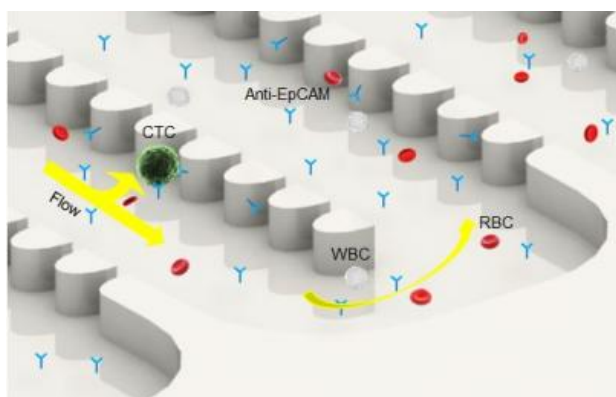
Figura 9 - Arranjo geométrico do dispositivo microfluídico



Um diferencial que foi abordado é a implantação dos filtros laterais, que aumentam a eficiência do método, pois o anticorpo é imobilizado na parte interna do canal. A junção desses filtros com o canal principal em serpentina promove um fluxo bidimensional com dois componentes de velocidade: um ao longo da direção do canal principal e outro na direção do filtro, reduzindo a obstrução das células. Além disso, possibilita o contato direto entre as CTC e os filtros funcionalizados, promovendo uma interação significativamente maior entre anticorpo e antígeno.

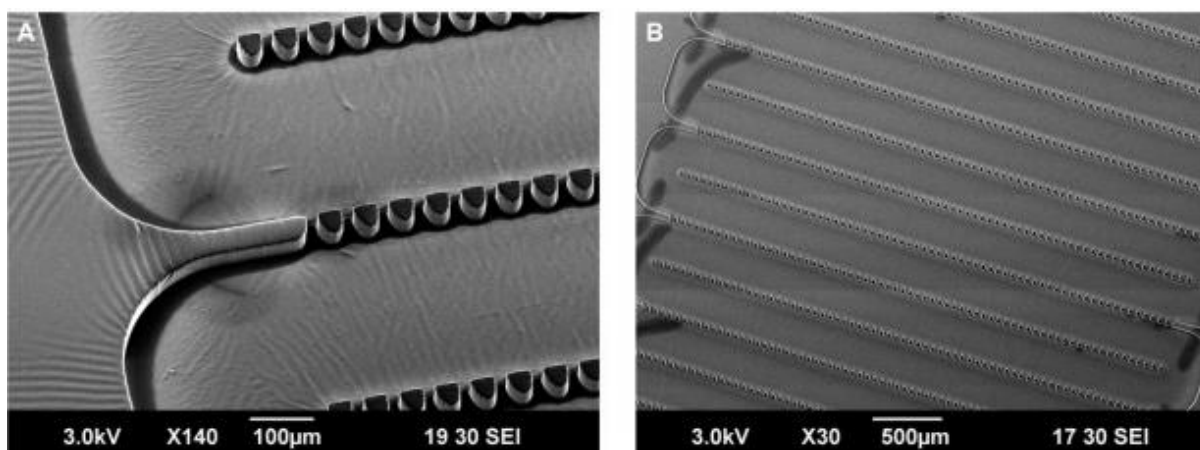
Diferentes zonas de tamanhos ao longo do canal contribuem para a regulação do fluxo, permitindo que apenas uma única CTC possa cruzar o filtro, evitando que a CTC seja envolvida por outras células sanguíneas e aumentando o contato da CTC com o anticorpo. O canal principal reduz a resistência hidrodinâmica geral do dispositivo e diminui a velocidade do fluxo nos filtros. A **Figura 10** ilustra esse esquema mostrando que os filtros são em formato de cunha, com uma abertura mais larga na entrada, o que evita a deformação celular.

Figura 10 - Ilustração do canal principal com as serpentinhas funcionalizadas com o anticorpo



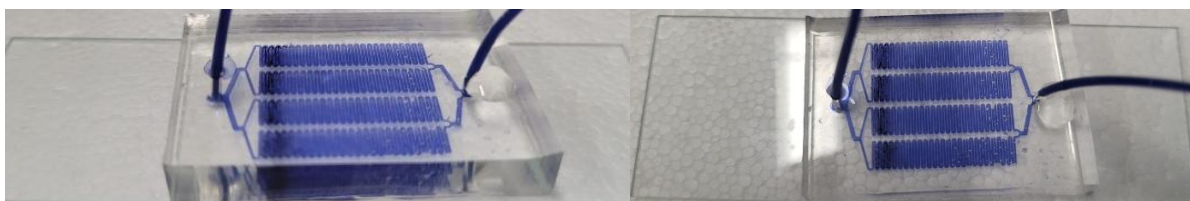
A **Figura 11** apresenta uma microscopia eletrônica de varredura do dispositivo, sendo possível observar o canal de serpentina principal e os filtros laterais. Na primeira imagem, apresentada numa escala de 100 μm , é nítido o formato de cunha já mencionado para evitar deformação e melhorar a captura. A segunda imagem está numa escala menor, 500 μm , permitindo uma visão mais geral de uma das colunas principais.

Figura 11 - Microscopia eletrônica de varredura do dispositivo microfluídico



Depois que o dispositivo é retirado do molde, todas as perfurações são feitas e o mesmo é acoplado a uma lâmina de microscópio, o dispositivo está finalizado. A **Figura 12** mostra o produto final, pronto para testes. Foi feita uma passagem de azul de tripan para facilitar a visualização dos microcanais, já que, sem corante, ele é transparente.

Figura 12 - Imagens do dispositivo microfluídico



4.2 CULTURA CELULAR

4.2.1 GLIOBLASTOMA

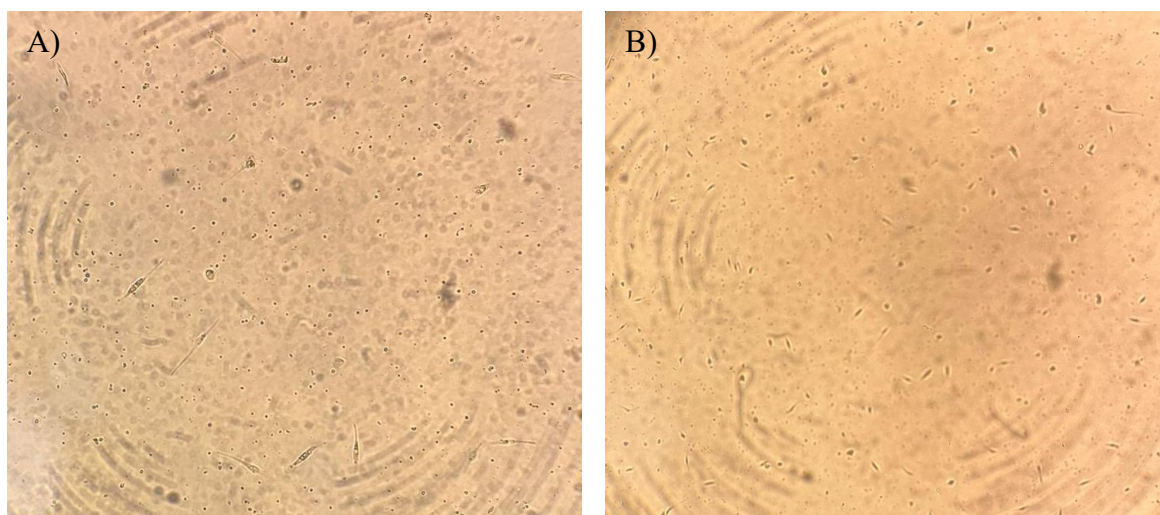
As células de glioblastoma são uma cultura primária derivada de uma extração do tecido tumoral. O cultivo não apresentou qualquer tipo de problema em seu cultivo, como contaminação bacteriana ou falta de desenvolvimento celular, evidenciando uma coleta adequada e uso de meio correto.

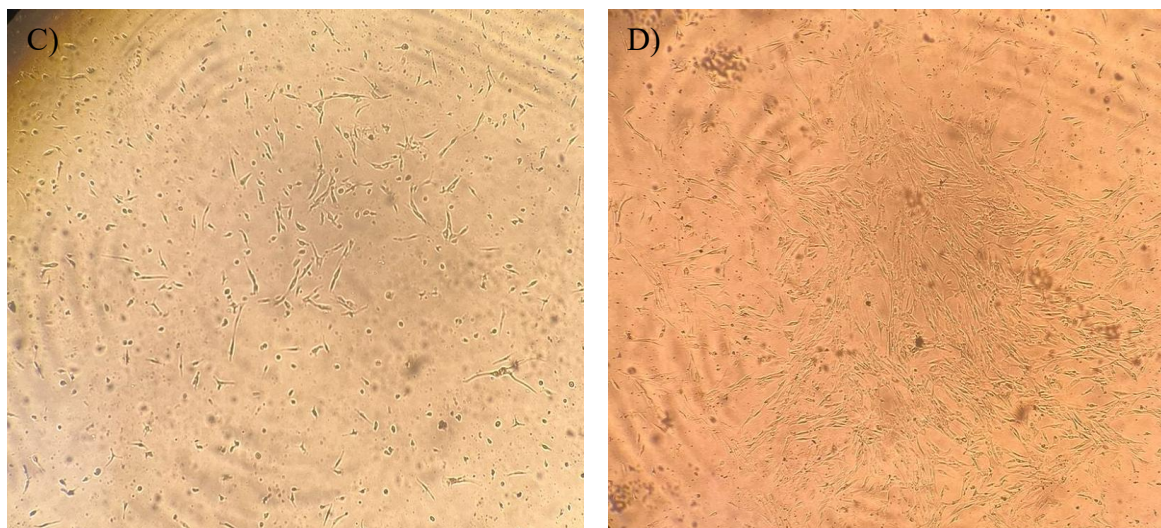
A **Figura 13** apresenta o crescimento e aderência celular ao decorrer dos dias, onde **A)** apresenta o dia em que a célula foi extraída, as bolinhas são as células antes de aderirem a superfície da garrafa de cultura; em **B)** havia se passado 3 dias, junto com a troca do meio as células que não aderiram foram retiradas no sobrenadante, e as que ficaram já começaram a mostrar seu formato, saindo do arredondado e apresentando pequenos alongamentos; **C)** a imagem foi tirada depois de 10 dias, é possível observar uma proliferação mais avançada e formatos mais definidos; **D)** ocorreu depois de 17 dias chegando a uma boa confluência, o meio apresenta certa aglomeração, onde as células ficam muito próximas umas das outras mas sem apresentar sobreposição.

Apesar de serem células que no organismo humano apresentam crescimento acelerado e rápida proliferação, quando cultivadas em meio celular acabam apresentando uma taxa de duplicação de população mais lenta, mesmo com a troca de meio periódica para fornecer sempre as melhores condições para proliferação, podendo ser estimada em aproximadamente 38 horas.

Referente a sua morfologia as células de glioblastoma são do tipo aderente, tendo uma forma alongada e crescem em monocamadas, seu tamanho varia de 12 a 14 μm de diâmetro. Foram realizadas diversas subculturas, as que não foram utilizadas para os experimentos foram congeladas para estudos futuros.

Figura 13 - Crescimento da cultura celular primária do glioblastoma A) 1º dia, B) 3º dia, C) 10º dia e D) 17º dia





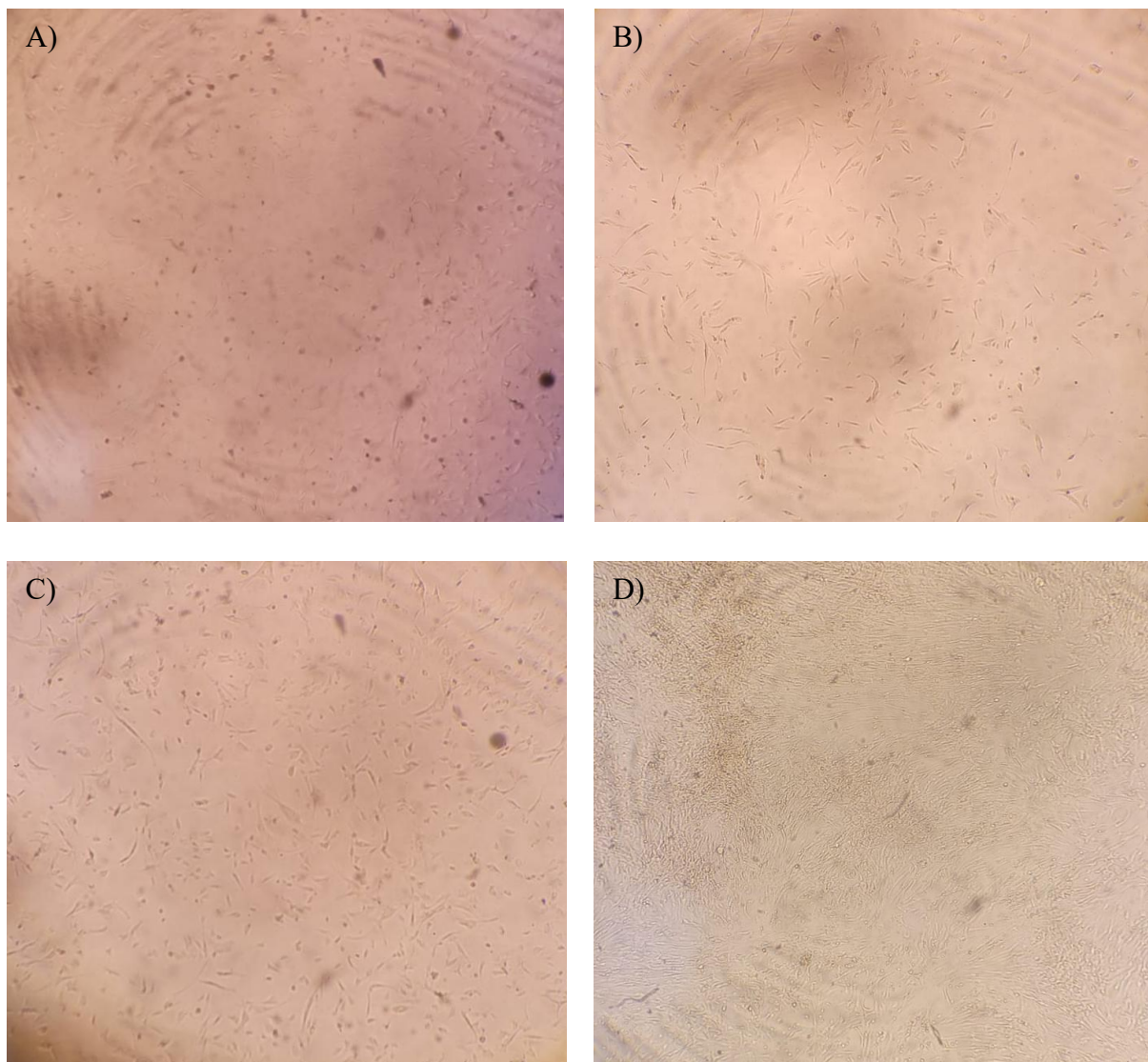
4.2.2 MENINGIOMA

As células do meningioma também são derivadas de uma cultura celular primária extraída de um pedaço de tecido tumoral. Ao decorrer da cultura celular não foram identificados nenhuma interferência, comprovando uma extração adequada e meio de cultura correto.

A **Figura 14** representa a evolução do crescimento celular com passar dos dias, em **A)** é possível analisar as células no dia da extração, onde depois da retirada do sobrenadante apresenta diversos mini filamentos clarinhos que representam as células que ainda não estão aderidas; **B)** foi tirada três dias depois, onde já é visível a aderência na superfície da garrafa, sendo possível observar sua estrutura alongada; em **C)** haviam se passado seis dias do começo do cultivo e a população celular já havia dobrado de tamanho; **D)** ocorreu depois de 15 dias apresentando uma confluência avançada, com uma boa distribuição na superfície mesmo que de forma aglomerada.

As células de meningioma no cultivo celular acabaram mostrando uma taxa de duplicidade mais avançada que no organismo humano, podendo ser estimada em aproximadamente 22 horas. Seu formato é semelhante ao do tecido epitelial, sendo alongada, mas um pouco mais achatada que as de glioblastoma. Seu tamanho varia de 16 a 20 μm de diâmetro. As subculturas não utilizadas nos experimentos foram congeladas para futuras análises.

Figura 9 - Crescimento da cultura celular primária do meningioma A) 1º dia; B) 3º dia, C) 6º dia e D) 15º dia



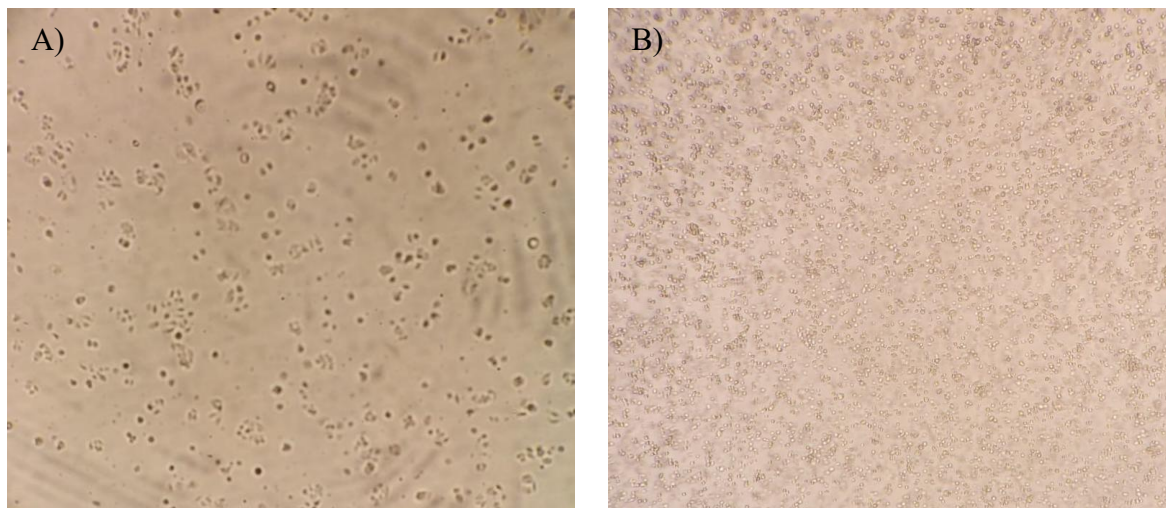
4.2.3 MCF-7

As células MCF-7 são células de cancro da mama dependentes de hormonas, tem baixo potencial metastático, sua morfologia é do tipo epitelial. Seu crescimento é do tipo de adesão em monocamadas com forte adesão célula-célula, é uma célula típica de crescimento lento sendo necessária uma cultura mais densa de células.

A **Figura 15A)** foi tirada no dia seguinte do descongelamento, depois da retirada do sobrenadante, é possível observar que algumas células já aderiram na garrafa. A **Figura 15B)** foi tirada quase duas semanas depois, devido a sua característica de crescimento mais lenta, sendo necessário mais tempo para atingir os 90% de confluência necessário. Sua morfologia é

mais arredondada, devido a sua adesão em monocamadas ela apresenta tendência a se aglomerar formando aglomerados celulares, seu tamanho varia de 19,9 a 33,9 μm .

Figura 15 - Células MCF-7 com A) em baixa densidade e B) em alta densidade



4.3 FLUXO

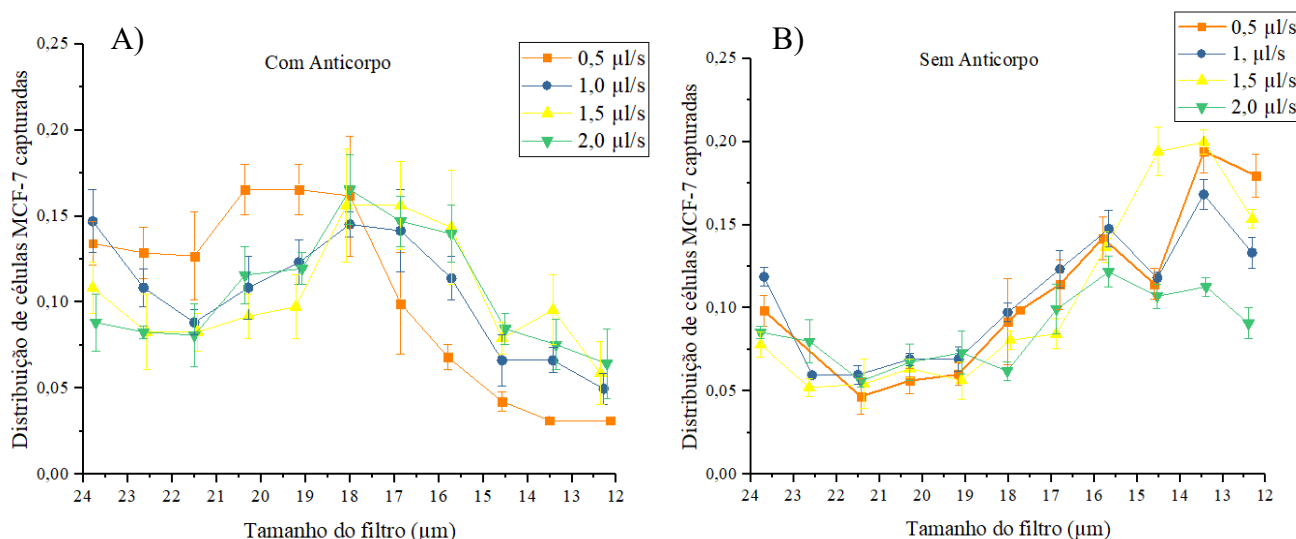
Para o estudo do fluxo que iria fornecer a maior quantidade de células capturadas sem danificação foram passadas aproximadamente 10000 células MCF-7 marcadas com fluorescência. As células foram injetadas em dispositivos que estavam funcionalizados com anti-EpCAM e em dispositivos que apenas tinham sido neutralizados com BSA. As taxas de fluxo testadas foram de 0,5 $\mu\text{L/s}$, 1,0 $\mu\text{L/s}$, 1,5 $\mu\text{L/s}$, 2,0 $\mu\text{L/s}$. A taxa de captura é definida como a razão entre o número de células capturadas em alguma zona do filtro e o número total de células capturadas no dispositivo.

A **Figura 16A)** apresenta a distribuição das taxas de captura celular em diferentes zonas com a taxa de fluxo variada com a funcionalização do anti-EpCAM. Para o fluxo de 0,5 $\mu\text{L/s}$ a primeira metade do fluxo apresentou um percentual de taxa de captura de 82%, seguido por um decréscimo exponencial na segunda metade, com a maior taxa de captura entre seus 22,6 μm e 16,9 μm . Já na para os outros fluxos são possíveis observar um padrão comportamento bem parecido entre eles, tendo uma maior porcentagem de captura celular na metade mais próxima do fim, zona de 18,05 μm a 12,3 μm , aumentando à medida que a taxa do fluxo diminui.

Na **Figura 16B)** a primeira metade apresenta taxa de captura baixa, é a partir das zonas de filtro 15,7 μm que começa a aparecer os picos prevalecendo até o fim das zonas, isso ocorre

devido ao tamanho do filtro nas zonas finais serem menores e mais próximos um dos outros. Sem a presença do anti-EpCAM as quatro taxas de infusão seguem um padrão e não apresenta diferenças significativas entre si.

Figura 16 - Distribuição da captura de células MCF-7 em relação com o tamanho do filtro A) com a funcionalização com anticorpo, B) sem a funcionalização com anticorpo



Algumas resoluções podem ser obtidas dos resultados apresentados. Primeiramente, ocorre um aumento de captura significativo com o aumento da velocidade do fluxo, assim, mais células são capturadas na segunda metade do microcanal, local onde os tamanhos dos filtros são parecidos ou menores do que o tamanho das células testadas.

Consequente, a zona de filtro inicial, 23,8 μm, fornece alta taxa de captura de células, mesmo nas taxas de infusão relativamente mais altas. Por fim, filtros com tamanhos similares ao diâmetro das células dão o melhor efeito de aprimoramento de captura de células. As taxas mais altas de fluxo apresentam entre as zonas 18 μm e 15,7 μm uma taxa de captura celular relativamente alta.

Comparando os dispositivos imobilizados com o anti-EpCAM e os sem a imobilização é notória a perda de eficiência de captura celular. O fato da primeira metade ter uma baixa taxa de captura em dispositivos não funcionalizados se dá pelo fato de as células serem muito menores que o tamanho do filtro, e por não ter nenhum componente que promova fixação no local faz com que elas passem direto.

Outro fator importante a ser analisado é que sem a imobilização as células ficam presas nos filtros menores ou de tamanho semelhante o que pode promover uma deformidade celular devido a compressão celular. Portanto, a funcionalização com o anti-EpCAM promove uma

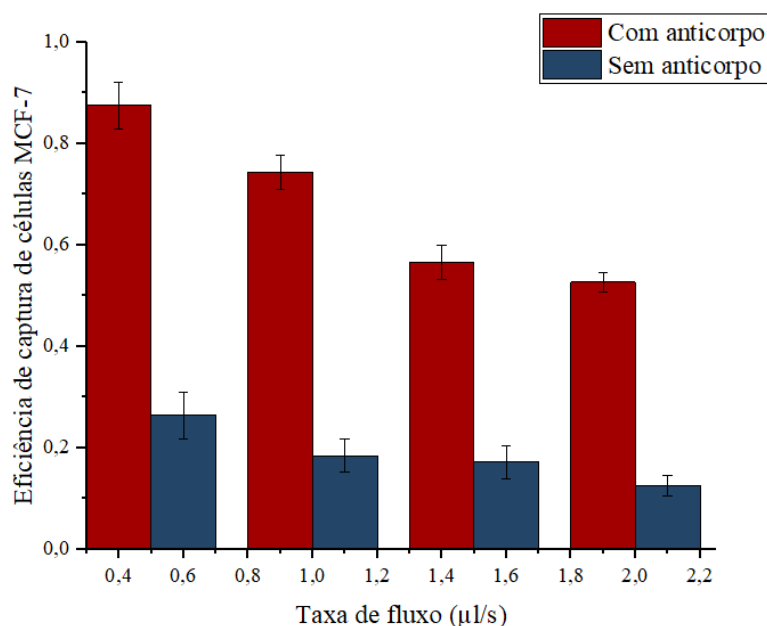
melhoria significativa da capacidade de captura de células baseada em afinidade confirmando a importância do anticorpo no dispositivo microfluídico.

4.4 TESTE DE EFICIÊNCIA DE CAPTURA

O teste de eficiência de captura foi realizado com o intuito de analisar como o anti-EpCAM imobilizado no dispositivo influencia na captura celular. A **Figura 17** refere-se ao comparativo usando as células MCF-7, as colunas azuis são as que não tem o anticorpo, mostram sua baixa eficiência de captura das células. Enquanto a taxa de captura de 0,5 $\mu\text{L/s}$ chega a 87% com o anticorpo, sem ele a taxa chega a 22%, em 1,0 $\mu\text{L/s}$ a taxa chega a 75% com a presença do anticorpo e 18% sem, 1,5 $\mu\text{L/s}$ e 2,0 $\mu\text{L/s}$ apresentam resultados parecidos de aproximadamente 51% com o anticorpo e 16% sem ele.

Em todas as taxas de fluxo a presença do anticorpo apresentou a taxa de captura sempre sendo maior que 50% e sem o anticorpo não passa dos 18%, comprovando novamente como o seu uso aumenta significativamente a eficiência de captura.

Figura 17 - Eficiência de captura das células MCF-7, de acordo com a taxa de fluxo para a condição de revestimento do anticorpo e sem o revestimento

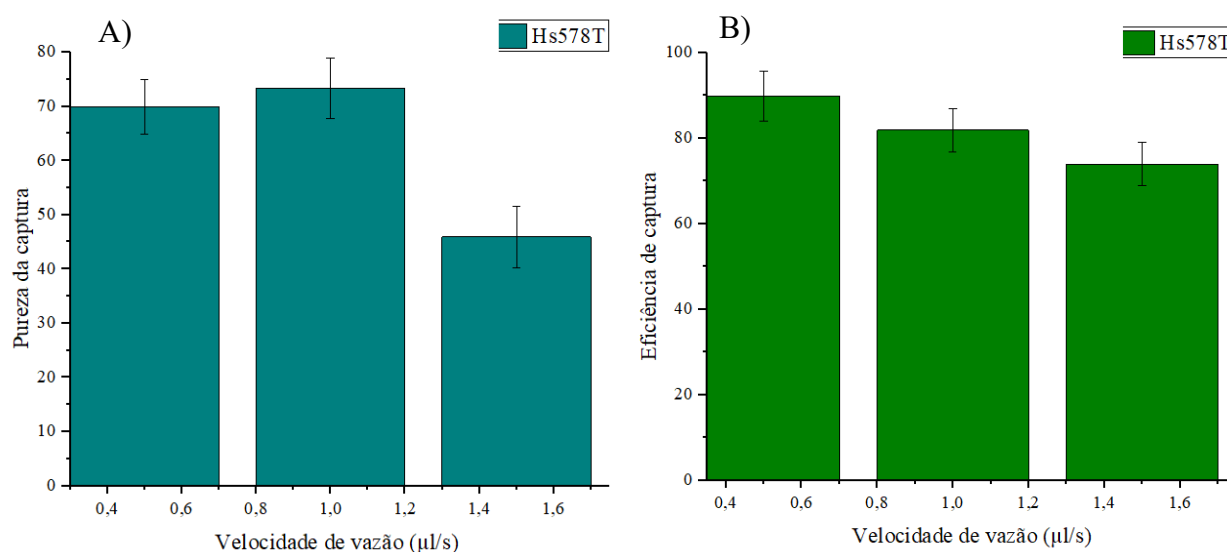


Para estudar se a presença de outras células nucleadas com as MCF-7 iria alterar na eficiência de captura das CTCs foi testado uma solução com mistura de células MCF-7 com células CCRF-CEM, numa proporção de 1:20, que não reagem com o EpCAM.

A **Figura 18A)** apresenta a pureza de captura, que consiste na capacidade do dispositivo de capturar especificamente as CTCs dentro de um fundo de células contaminantes. A pureza é expressa pela razão do número de CTCs capturadas pelo número total de células nucleadas capturadas. O fluxo que apresentou maior pureza foi o 1,0 $\mu\text{L/s}$ com 74%, seguido do fluxo de 0,5 $\mu\text{L/s}$ com 70% e o de 1,5 $\mu\text{L/s}$ com 45%. A diminuição da pureza com o aumento da taxa de fluxo torna o uso clínico menos promissor.

Na **Figura 18B)** é possível observar a eficiência de captura, esta é calculada através da razão do número de células alvos capturadas sobre o número total de células (alvo e não alvo). Para o fluxo de 0,5 $\mu\text{L/s}$ a eficiência chega a 89%, para o fluxo de 1,0 $\mu\text{L/s}$ a eficiência chega a 81% e 71% para o fluxo de 1,5 $\mu\text{L/s}$. Resultando em uma perda de eficiência muito baixa comparada aos resultados em que as células MCF-7 puras eram analisadas, mostrando como o EpCAM realmente só captura células positivas a ele.

Figura 108 - Captura de células alvo a partir de mistura de células na velocidade de 0,5 a 1,5 $\mu\text{L/s}$ em relação: A) Pureza e B) Eficiência

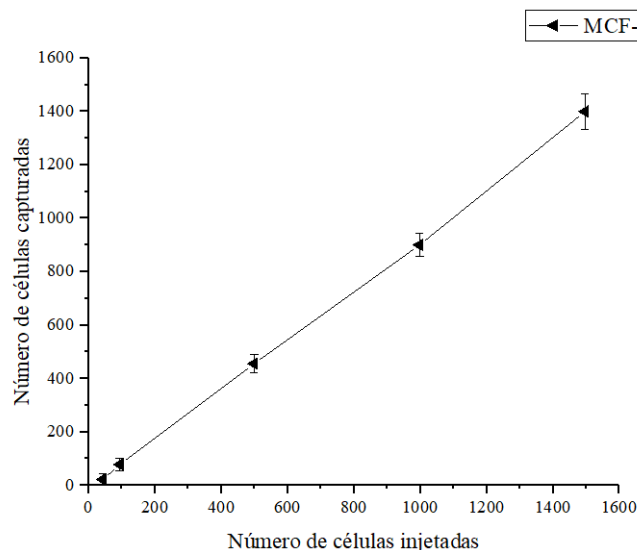


Para o teste que analisava o efeito da matriz foi injetado uma solução que tinha faixa de concentração de 100 a 1600 células de MCF-7 em uma quantidade de sangue que não havia CTCs, consequente foi feita a captura e contagem dessa amostra. A **Figura 19** apresenta o gráfico com a curva de calibração que foi obtida, é possível observar uma boa linearidade do método.

A eficiência de captura obtida ficou acima dos 88% apresentando uma variação de $\pm 4,5\%$, sendo um valor bem similar ao teste de eficiência de captura com as células puras em

solução tampão que chegaram a 87%, apresentando coerência de captura celular independente do meio que as células se encontram.

Figura 119 - Curva de calibração obtida nas concentrações entre 100-1600 células MCF-7



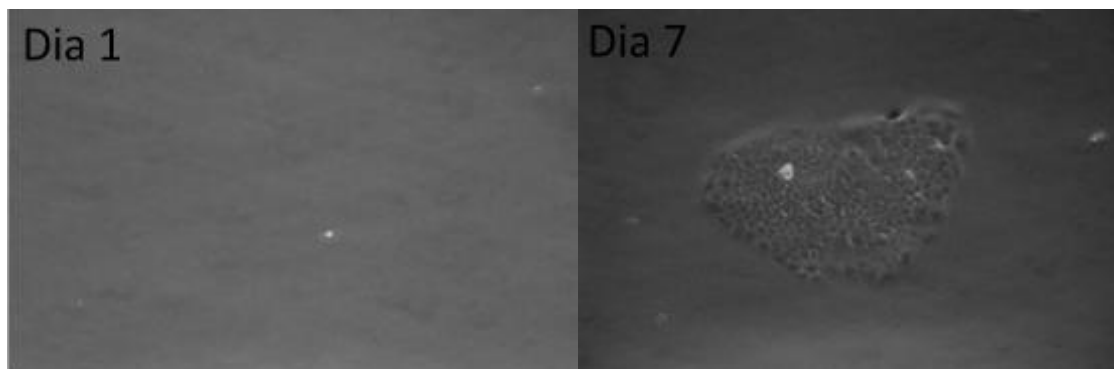
Na literatura o uso do EpCAM expressado na linhagem de células MCF-7 sempre se mostrou muito alto, sendo uma combinação usada recorrentemente em estudos que investigam essa afinidade, estando na casa dos 90% de expressão, o que é condizente com o nosso resultado de 87% de eficiência de captura quando ele é utilizado, sua eficiência acaba decaindo com o aumento do fluxo, mas sempre mostrando diferenças significativas [154].

4.5 LIBERAÇÃO DAS CÉLULAS

A fim de analisar as CTCs após a captura é necessário fazer uma liberação das células presentes nas serpentinhas do dispositivo microfluídico. Esse processo é de extrema importância quando visam futuras análises genômicas e efeito na viabilidade celular das células tumorais capturadas, sempre presando pela pureza e viabilidade das CTCs.

As células MCF-7 foram liberadas como discutido na metodologia e então cultivadas em uma placa de Petri por uma semana. A **Figura 20** mostra a cultura celular no dia da liberação, onde é possível observar apenas poucas células presentes, após sete dias de cultura a célula central se proliferou mostrando uma cultura localizada, as outras se mantiveram como estavam ou apenas se duplicaram, não apresentando um desenvolvimento tão eficiente.

Figura 20 - O crescimento das células ao decorrer dos dias após serem liberadas



A eficiência de liberação de células do dispositivo funcionalizado com anticorpo foi de 50%. A sua funcionalização que utiliza de um anticorpo para uma maior afinidade precisa ser tratada com uma solução de tripsina para desassociar a ligação EpCAM-anticorpo, essa solução pode causar leves alterações na membrana celular devido à quebra da ligação. A baixa viabilidade obtida provavelmente é resultado desse tratamento com tripsina e sua degradação celular, já que a literatura já apresentou dados de como a tripsina causa danos à membrana celular e à matriz extracelular reduzindo a proliferação celular inicial e mostrando atraso na primeira divisão celular [155].

Este resultado se mostra estimulante e comprova a possibilidade de liberação das CTCs capturadas permitindo um avanço ainda maior no estudo personalizado das células de cada paciente focalizada em cada caso.

4.6 TESTE COM A AMOSTRA CLÍNICAS

As amostras de sangue dos pacientes passaram por uma etapa de preparação essencial para permitir a análise e a distinção das células tumorais circulantes (CTCs) das demais células normais presentes no sangue periférico. Entre os procedimentos realizados, destaca-se a marcação imunofluorescente utilizando três marcadores amplamente consolidados na literatura científica para identificação de CTCs: DAPI, CK e CD45.

O corante DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) se liga ao DNA e permite a visualização do núcleo celular. As citoceratinas (CKs), por sua vez, são proteínas do citoesqueleto características de células epiteliais, e sua marcação ocorre independentemente da viabilidade celular. Já o CD45, também conhecido como antígeno comum leucocitário, está presente em todas as células da linhagem hematopoiética, sendo utilizado como marcador de exclusão [156].

Dessa forma, as CTCs autênticas são classificadas como DAPI+, CK+, CD45–, referente aos filtros verde e vermelho devem ser positivos e laranja negativo, enquanto a combinação DAPI+, CK–, CD45+ é característica de leucócitos, e uma marcação tripla positiva pode indicar falso positivo, geralmente causado por impurezas na amostra. O uso combinado desses três marcadores contribui para uma análise com alta especificidade, sensibilidade e confiabilidade.

4.6.1 GLIOBLASTOMA

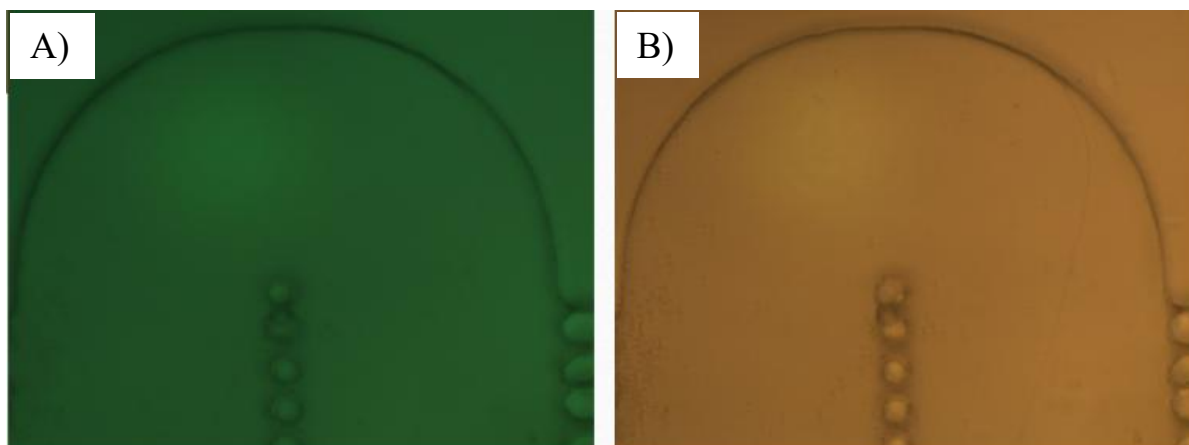
O Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu forneceu a amostra de sangue de dois pacientes com glioblastoma, de grau 4, o processamento da amostra e análise microscópica foram realizadas num intervalo de 4 horas após a coleta do material.

4.6.1.1 PACIENTE 1

No primeiro paciente foi possível observar a captura de 16 células tumorais circulantes, todas as serpentinas do chip foram analisadas microscopicamente, quando uma célula presa era identificada 3 filtros, um vermelho, um verde e um laranja, eram aplicados na imagem para comprovação das CTCs verdadeiras. Apenas aquelas que estavam nas serpentinas, apresentavam aspecto redondo e uniforme e passavam pela sequência de filtros foram contabilizadas.

Na **Figura 21A)** é possível observar o filtro positivo onde no meio encontra-se uma célula redonda e bem visível, já na **Figura 21B)** a célula está mais falhada na parte inferior e está mais na parte esquerda da serpentina enquanto a outra está centralizada mostrando que o filtro recombinau a célula sendo negativa.

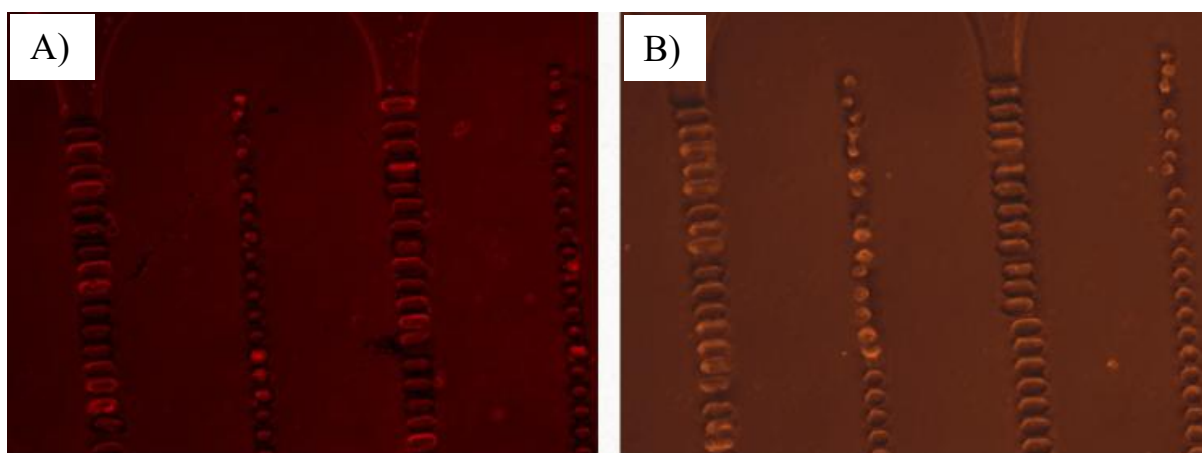
Figura 21 - Micrografia de amostra do paciente 1 com glioblastoma A) filtro positivo, B) filtro negativo



4.6.1.2 PACIENTE 2

O segundo paciente revelou um número menor de captura, apenas 9 CTCs foram contabilizadas. Na **Figura 22A)** é possível observar a CTC na primeira e terceira serpentina, ela está presa, mas mantém sua integridade, formato e uniformidade, quando passa para o filtro negativo na **Figura 22B)** as células quase desaparecem, enquanto é possível observar um leucócito na superfície do dispositivo e na terceira serpentina, onde é visível apenas no filtro positivo. Algumas células que se mostram positivas na primeira imagem e negativa na segunda, mas não estão presentes nas serpentinas não são contabilizadas mesmo seguindo a marcação de CTCs verdadeiras.

Figura 22 - Micrografia de amostra do paciente 2 com glioblastoma A) filtro positivo, B) filtro negativo

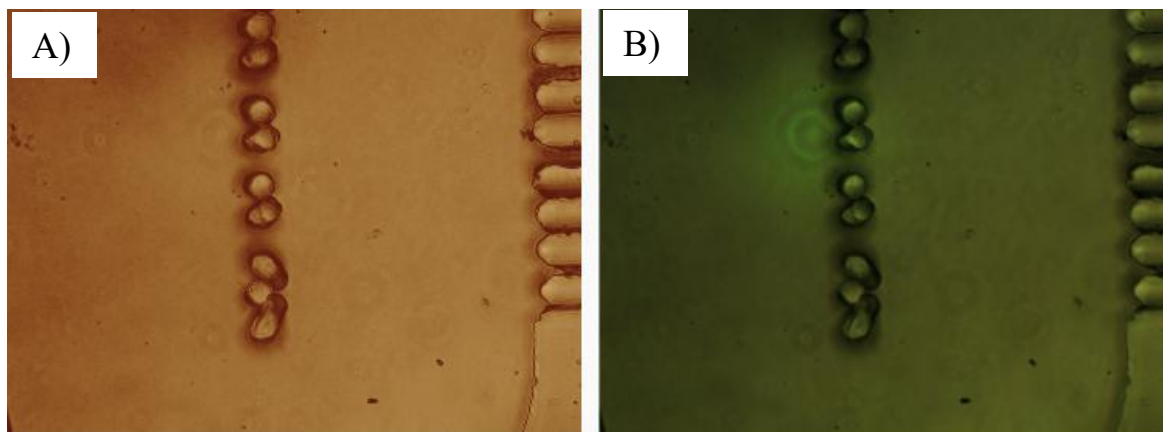


Ao analisar as condições de coleta e processamento, a fim de compreender a diferença no número de CTCs coletadas em pacientes com o mesmo tipo de tumor, observou-se que a amostra de sangue do primeiro paciente foi obtida após a ruptura da barreira hematoencefálica, o que pode ter favorecido a liberação de um maior número de CTCs na corrente sanguínea. Por outro lado, a amostra do segundo paciente foi coletada pouco antes da cirurgia, preservando apenas as CTCs que já estavam presentes na circulação.

4.6.2 MENINGIOMA

Foi feita análise de apenas um paciente com meningioma, de grau 1, e foi possível capturar 18 células tumorais circulantes presentes em seu sangue. Na **Figura 23A)** é possível ver o filtro negativo, com as paredes celulares falhadas e o formato não tão arredondado, já na **Figura 23B)** que apresenta o filtro positivo as paredes celulares e formato aparecem de forma muito mais visível e íntegro.

Figura 23 - Micrografia de amostra do paciente com meningioma A) filtro negativo, B) filtro positivo



Os resultados apresentados acima indicam que o dispositivo microfluídico desenvolvido neste projeto supera limitações que a literatura apresentou, como o fato que o EpCAM limitar severamente a detecção eficaz de CTCs em tumores do sistema nervoso central devido a origem não epitelial e heterogeneidade tumoral [32]. Ao combinar o método de separação física com a afinidade do EpCAM, o dispositivo proposto possibilitou a captura de CTCs em quantidades compatíveis com os valores descritos na literatura, indicando sua viabilidade e potencial aplicação em cenários clínicos e de pesquisa.

5 CONCLUSÃO

O presente trabalho demonstrou com êxito no desenvolvimento e na validação de um dispositivo microfluídico voltado para a captura de células tumorais circulantes (CTCs). A produção do molde em *wafer* de silício por fotolitografia e a posterior fabricação do dispositivo em PDMS através de litografia macia revelaram-se altamente eficientes, resultando em estruturas estáveis, reprodutíveis e funcionalmente adequadas para testes celulares. A análise dos ensaios experimentais indicou que o desempenho do dispositivo é influenciado diretamente pela velocidade do fluxo, com um aumento significativo na eficiência de captura proporcional ao aumento da taxa de infusão, sem comprometer a viabilidade celular. Através desse entendimento foi possível definir como melhor fluxo e o usados para os testes com amostra de sangue o fluxo de 1,5 $\mu\text{L/s}$.

Outro ponto fundamental foi a confirmação do papel crítico da funcionalização com anticorpo anti-EpCAM. A presença deste marcador conferiu seletividade ao sistema e resultou em um aumento expressivo na taxa de captura de células EpCAM-positivas, como as linhagens MCF-7, glioblastoma e meningioma. Essa funcionalização se mostrou substancial para uma captura efetiva, precisa e altamente específica, validando o uso da afinidade biológica como ferramenta complementar à separação física.

Adicionalmente, o dispositivo permitiu a posterior liberação das células capturadas, o que abre a possibilidade de análises moleculares e funcionais em nível individual. Isso representa uma importante contribuição para o avanço da medicina personalizada, ao permitir o estudo dinâmico da heterogeneidade tumoral a partir de CTCs viáveis, isoladas diretamente do sangue periférico.

Do ponto de vista experimental, foi possível obter e expandir com sucesso as linhagens celulares primárias de glioblastoma e meningioma, sem sinais de contaminação, o que reforça a qualidade das amostras utilizadas e a confiabilidade dos resultados. Finalmente, a aplicação do sistema em amostras clínicas demonstrou sua capacidade real de capturar CTCs em pacientes, atingindo números promissores que sustentam a aplicabilidade do dispositivo em contextos de triagem diagnóstica e monitoramento terapêutico.

Em síntese, o dispositivo desenvolvido apresenta um avanço na tecnologia de biópsia líquida para cânceres do sistema nervoso central e outros tipos tumorais. Sua combinação de simplicidade estrutural, baixo custo e eficiência funcional mostra um potencial para análises

posteriores podendo contribuir significativamente para o diagnóstico precoce e o acompanhamento da evolução tumoral.

6 REFERÊNCIA

1. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. Câncer. **Ministério da Saúde**. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/c/cancer>>. Acesso em: 28 novembro 2024.
2. THOMPSON, T. &. Genética e Genômica do câncer. In: _____ **Genética Médica**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016. Cap. 15, p. 560.
3. UFG. Bases Genéticas do Câncer. **Ensino de Biologia**. Disponível em: <https://publica.ciar.ufg.br/ebooks/ensino-de-biologia/Mod2Cap2_Parte_II/conteudo/7-1.html>. Acesso em: 28 novembro 2024.
4. WARD, L. S. Entendendo o Processo Molecular da Tumorigênese. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, Campinas, agosto 2002.
5. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. Como surge o câncer? **Ministério da Saúde**, 2022. Disponível em: <<https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/como-surge-o-cancer>>. Acesso em: 28 novembro 2024.
6. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Câncer. **Organização Pan-Americana da Saúde**, 2020. Disponível em: <<https://www.paho.org/pt/topicos/cancer>>. Acesso em: 28 novembro 2024.
7. FARIA, Á. Câncer: Mutação somática x germinativa. **Blog Mendelics**, 2022. Disponível em: <<https://blog.mendelics.com.br/mutacao-somatica-e-mutacao-germinativa/>>. Acesso em: 28 novembro 2024.
8. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. Instituto Nacional de Câncer. **INCA**, 2022. Disponível em: <<https://gov.br/inca/pt-br>>. Acesso em: 28 novembro 2024.
9. OPAS- ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. Câncer. **Organização Mundial da Saúde**, 2020. Disponível em: <<https://www.paho.org/pt/topicos/cancer>>. Acesso em: 29 novembro 2024.

10. SANTOS¹, M. D. O. et al. Estimativa de Incidência de Câncer no Brasil, 2023-2025. **Revista Brasileira de Cancerologia**, p. 12, 2023.
11. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. Estimativa 2023- Incidência de Câncer no Brasil, Rio de Janeiro, novembro 2022.
12. DAVID N LOUIS, A. P. P. W. . D. J. B. . I. A. C. D. F.-B. C. H. H. K. N. S. M. P. G. R. R. S. A. V. D. A. D. W. E. The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central. **Neuro-Oncology**, 29 junho 2021. 21.
13. AMERICAN CANCER SOCIETY. About Brain and Spinal Cord Tumors in Adultus, 5 maio 2020. 21.
14. MACKENZIE PRICE, M. P. H. C. B. M. P. H. J. B. M. B. S. C. N. M. P. H. G. C. M. P. H. K. A. W. P. D. C. K. B. A. J. S. B.-S. P. D. Q. T. O. P. D. . M. P. H. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2017–2021. **Neuro-Oncology**, 6 outubro 2024. 1-85.
15. ROJAS, H.; RITTER, C.; DAL PIZZOL, F. Mecanismos de disfunção da barreira hematoencefálica no paciente criticamente enfermo: ênfase no papel das metaloproteinases de matriz. **Rev. bras. ter. intensiva**, v. 23, n. 2, 2011.
16. NARSINH, K. H. . P. E. . H. A. F. E. A. Strategies to Improve Drug Delivery Across the Blood–Brain Barrier for Glioblastoma. **Curr Neurol Neurosci Rep**, v. 24, p. 123-139, 2024.
17. MATHEW-SCHMITT, S. . P. M. . N. P. E. A. Blood-tumor barrier in focus - investigation of glioblastoma-induced effects on the blood-brain barrier. **J Neurooncol** , v. 170, p. 67-77, 2024.
18. MCDONALD, B. . B. K. & S. M. H. H. The origin of brain malignancies at the blood–brain barrier. **Cell. Mol. Life Sci.** , v. 80, 2023.
19. RAFAEL TUZINO LEITE NEVES MAFFEI¹, I. R. D. M. F. Frequência dos tipos histológicos de tumores no sistema nervoso central em um hospital universitário: levantamento de casos ao longo de quatro anos. **Arquivos**

Médicos do Hospital da Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, São Paulo, 2021.

20. WELLER, M. E. A. EANO guidelines on the diagnosis and treatment of adult astrocytic and oligodendroglial gliomas. **The Lancet Oncology**, v. 22, n. 7, p. 281-294, 2021.
21. NÔVO, P. C. REALIZAÇÃO DE BIÓPSIA LÍQUIDA PARA EXTRAÇÃO DE. **UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS**, Manaus, 2024.
22. RENATA TARRAF FERNANDES, G. R. T. E. C. M. G. A. B. A. E. M. Nova classificação das neoplasias gliais segundo a Organização Mundial da Saúde 2021, com enfoque radiológico. **Radiologia Brasileira**, v. 56, agosto 2023.
23. REIFENBERGER G, W. H. K.-T. C. W. M. Advances in the molecular genetics of gliomas - implications for classification and therapy.. **Nat Rev Clin Oncol**, p. 18, julho 2017.
24. NABORS, L. B. et al. Central Nervous System Cancers. **NCCN CLINICAL PRACTICE GUIDELINES IN ONCOLOGY**, novembro 2020. 34.
25. SIMON GRITSCH, T. T. B. L. N. G. C. Diagnostic, Therapeutic, and Prognostic Implications of the 2021 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System. **Cancer**, p. 12, janeiro 2022.
26. LONE SF, N. S. M. T. S. M. R. A. H. S. E. W. B. D. B. S. H. M. B. A. M. M. Liquid biopsy: a step closer to transform diagnosis, prognosis and future of cancer treatments. **Molecular Cancer**, 2022.
27. GINER, F. Cancer Diagnosis Using a Liquid Biopsy: Challenges and Expectations. **Diagnosis**, v. 8, 2018.
28. MARTINS, I. et al. Liquid biopsies: Applications for cancer diagnosis and monitoring. **Genes**, v. 12, p. 349, março 2021.

29. CHIBUK, J. et al. Horizons in Veterinary Precision Oncology: Fundamentals of Cancer Genomics and Applications of Liquid Biopsy for the Detection, Characterization, and Management of Cancer in Dogs. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 8, março 2021.
30. VICTOR NOWOSH, C. D. O. M. S. G. Detecção de células tumorais circulantes (CTCs) por isolamento baseado em tamanho e reação em cadeia da polimerase via transcriptase-reversa em tempo real (RT-qPCR) em cães com melanoma oral. **USP**, São Paulo, 2022.
31. PALMIROTTA R, L. D. C. P. F. C. M. F. P. E. Q. D. T. M. S. F. Liquid biopsy of cancer: a multimodal diagnostic tool in clinical oncology. **Ther Adv Med Oncol**, 2018.
32. AMITAVA RAY, T. K. V. Liquid biopsy—from bench to bedside. **Neuro-Oncology Advances**, 2022.
33. ADRANA CARNEIRO, P. P. L. D. L. L. CIRCULATING TUMOUR CELLS: A PORTUGUESE CONTRIBUTION TOWARDS PRECISION MEDICINE. **Revista Portuguesa de Cirurgia**, 2020.
34. DOTAN, E. et al. Circulating tumor cells: Evolving evidence and future challenges., v. 14, p. 1070-1082, 2009.
35. DANFENG LIN, L. S. M. L. K. Z. J. L. Q. Y. F. Z. D. Z. S. Z. Y. C. J. Z. Circulating tumor cells: biology and clinical significance. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, 2021.
36. ALEXANDER RING, B. D. N.-S. A. W. N. A. Biology, vulnerabilities and clinical applications of circulating tumour cells. **nature reviews cancer**, v. 23, fevereiro 2023.
37. ALHAJJ, M.; ZUBAIR, M.; FARHANA., A. Enzyme Linked Immunosorbent Assay. **StatPearls**, 2023.
38. NEVES, S. M. N.; GUEDES, R. M. C. HIBRIDIZAÇÃO IN SITU FLUORESCENTE: PRINCÍPIOS BÁSICOS E PERSPECTIVAS PARA O

DIAGNÓSTICO DE DOENÇAS INFECCIOSAS EM MEDICINA VETERINÁRIA. **Arq. Inst. BioL.**, v. 79, p. 627-632, 2012.

39. YOON-TAE KANG, A. B. E. P. K. S. A. C. D. C. M. R. E. J. D. Dual isolation and profiling of circulating tumor cells and circulating tumor DNA from a single liquid sample using the Genesis Cell Isolation System and Droplet Digital PCR. **Cancer Res**, v. 84, 2024.
40. RIETHDORF, S. et al. Detection of Circulating Tumor Cells in Peripheral Blood of Patients with Metastatic Breast Cancer: A Validation Study of the CellSearch System, v. 13, p. 920-928, 2007.
41. HAIMENG PEI, L. L. Z. H. Y. W. B. T. Recent advances in microfluidic technologies for circulating tumor cells: enrichment, single-cell analysis, and liquid biopsy for clinical applications. **Lab Chip**, v. 20, p. 3854-3875, novembro 2020.
42. E., E. The ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay. **Clin Chem**, v. 56, p. 319-320, 2010.
43. KOHL TO, A. C. Direct Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). **Cold Spring Harb Protoc**, v. 7, 2017.
44. TABATABAEI MS, A. M. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). **Methods Mol Biol.**, v. 2508, p. 115-134, 2022.
45. KOHL TO, A. C. Immunometric Double-Antibody Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. **Cold Spring Harb Protoc**, v. 6, 2017.
46. ZHIGUO YU, Y. Y. W. F. P. H. Y. L. J. S. Dual Tumor Exosome Biomarker Co-recognitions Based Nanoliquid Biopsy for the Accurate Early Diagnosis of Pancreatic Cancer. **ACS Nano**, v. 12, p. 11384-11395, 2023.
47. ESLAMI-S, Z. . C.-H. L. E. . S. L. E. A. Circulating tumour cells and PD-L1-positive small extracellular vesicles: the liquid biopsy combination for prognostic information in patients with metastatic non-small cell lung cancer.. **Br J Cancer** , v. 130, p. 63-72, 2024.

48. ANA DÍAZ-FERNÁNDEZ, A. F. M. H. V. E. E. F. Electrochemical Cellulase-Linked ELASA for Rapid Liquid Biopsy Testing of Serum HER-2/neu. **ACS Measurement Science Au**, v. 3, p. 226-235, 2023.
49. RATH B, P. A. K. L. H. M. U. E. B. B. N. C. H. G. Small cell lung cancer: circulating tumor cell lines and expression of mediators of angiogenesis and coagulation. **Explor Target Antitumor Ther.**, v. 4, p. 355-365, 2023.
50. JIE ZHANG, W. Q. W. Z. Y. C. H. S. H. Z. X. L. Z. S. Tracking of trastuzumab resistance in patients with HER2-positive metastatic gastric cancer by CTC liquid biopsy. **Am J Cancer Res.**, v. 13, p. 5684-5697, 2023.
51. ANTOINE VASSEUR, N. K. F.-C. B. J.-Y. P. L. C. Clinical utility of circulating tumor cells: an update. **Molecular Oncology**, v. 15, p. 1647-1666, 2020.
52. SHIMU LUO, Y. O. T. Z. H. J. Y. W. J. Z. Z. Z. Optimal Strategy for Colorectal Cancer Patients' Diagnosis Based on Circulating Tumor Cells and Circulating Tumor Endothelial Cells by Subtraction Enrichment and Immunostaining-Fluorescence In Situ Hybridization Combining with CEA and CA19-9. **Journal of Oncology**, v. 2021, 2021.
53. LEI ZHAO, X. W. J. Z. & D. D. DNA methylome profiling of circulating tumor cells in lung cancer at single base-pair resolution. **Oncogene**, p. 1884-189540, 2021.
54. LI Y, W. Z. F. R. W. S. Z. T. T. X. A. Y. D. Clinical Utility of Circulating Tumor Cells in Patients With Esophageal Cancer. **Front. Oncol.**, v. 12, 2022.
55. TAO, H. . W. L. . L. Z. . X. C. Analysis of dignotics value of CTC and CTDNA in early lung cancer. **Cellular and Molecular Biology**, v. 69, p. 57-62, 2023.
56. ANANDA TIWARI, W. A. S. O. S. P. S. A. H. G. J. S. L. S. J. G. A. B. Application of digital PCR for public health-related water quality monitoring. **Science of The Total Environment**, v. 837, 2022.

57. PECORARO S., B. G. . B. M. . C. P. . D. G. M. . D. L. M. . D. E. . D. D. . E. R. . H.-J. A. . K. D. M. . K. J. . L. A. . M. D. . M. M. . P. A. . P. V. . S. C. . S. T. . S. S. . S. B. Overview and recommendations for the application of digital PCR. **EUR 29673 EN, Publications Office of the European Union**, p. 1-60, 2019.
58. MAO X, L. C. T. H. C. Y. L. K. Principles of digital PCR and its applications in current obstetrical and gynecological diseases. **Am J Transl Res.**, v. 11, p. 7209-7222, 2019.
59. JAESUNG CHOI ET AL. Simultaneous detection of tumor-derived mutations in DNA and RNA extracted from a single circulating tumor cell based on droplet digital polymerase chain reaction. **JCO** , v. 42, p. 15053.
60. NTZIFA A, K. A. G. V. L. E. Detection of EGFR Mutations in Plasma cfDNA and Paired CTCs of NSCLC Patients before and after Osimertinib Therapy Using Crystal Digital PCR.. **Cancers**, v. 13, p. 2736, 2021.
61. ALIKI NTZIFA, A. K. V. G. E. L. etection of EGFR mutations in plasma cfDNA and paired CTCs of NSCLC patients before and after osimertinib therapy using crystal digital PCR. **Cancer Res**, v. 82, 2022.
62. KIKI C ANDREE 1, G. V. D. 1. L. W. T. Challenges in circulating tumor cell detection by the CellSearch system. **Mol Oncol.**, p. 395-40710, 2015.
63. FARACE, F. . M. C. . V. N. E. A. A direct comparison of CellSearch and ISET for circulating tumour-cell detection in patients with metastatic carcinomas. **Br J Cancer** , v. 105, p. 847-853, 2011.
64. WANG, H. L. P. L. F. L. T. Application of CellSearch technique in detection of peripheral blood circulating tumour cell count in patients with head and neck cancer and its association with prognosis. **Oncology Letters**, v. 29, 2024.
65. REDUZZI C, D. C. S. G. L. M. R. M. A. V. A. D. P. Z. Y. V. M. D. C. E. A. Circulating Tumor Cell Clusters Are Frequently Detected in Women with Early-Stage Breast Cancer. **Canceres**, v. 133, 2021.

66. MCDONALD, J. C. et al. Fabrication of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane). **Electrophoresis**, p. 27-40, 2000.
67. FIORINI, G. S.; CHIU, D. T. Disposable microfluidic devices: Fabrication, function, and application. **Biotechniques**, p. 429-446, 2005.
68. WHITESIDES, G. M. The origins and the future of microfluidics. **Nature**, p. 368-373, 2006.
69. CONVERY, N.; GADEGAARD, N. 30 Years of Microfluidics. **Micro. Nano Eng**, p. 76-91, 2019.
70. HAMDALLAH, S. I. et al. Microfluidics for pharmaceutical nanoparticle fabrication: The truth and the myth. **Int. J. Pharm**, 2020.
71. GHARIB, G. . B. I. . M. Z. . K. G. N. I. . S. S. S. . A. V. E. . T. E. . W. A. J. V. . K. A. Biomedical Applications of Microfluidic Devices: A Review. **Biosensors**, novembro 2022.
72. HAN, N. et al. Hybrid Lipid-Capped Mesoporous Silica for Stimuli-Responsive Drug Release and Overcoming Multidrug Resistance. **ACS Appl. Mater. Interfaces**, p. 3342-3351, 2015.
73. MILANE, L.; DUAN, Z.; AMIJI, M. Development of EGFR-Targeted Polymer Blend Nanocarriers for Combination Paclitaxel/Lonidamine Delivery To Treat Multi-Drug Resistance in Human Breast and Ovarian Tumor Cells. **Mol. Pharm**, v. 8, p. 185-203, 2011.
74. TARATULA, O. et al. Innovative Strategy for Treatment of Lung Cancer: Targeted Nanotechnology-Based Inhalation Co-Delivery of Anticancer Drugs and SiRNA. **Drug Target**, p. 900-914, 2011.
75. NAGRATH, S. et al. Isolation of Rare Circulating Tumour Cells in Cancer Patients by Microchip Technology. **Nature**, p. 1235-1239, 2007.

76. XU, H. et al. Magnetic-Based Microfluidic Device for On-Chip Isolation and Detection of Tumor-Derived Exosomes. **Anal. Chem**, p. 13451-13458, 2018.
77. KIM, C.-J. et al. Fully Automated, on-Site Isolation of CfDNA from Whole Blood for Cancer Therapy Monitoring. **Lab Chip**, p. 1320-1329, 2018.
78. PATRA, J. K. et al. Nano Based Drug Delivery Systems: Recent Developments and Future Prospects. **Nanobiotechnol**, 2018.
79. HATHAWAY, H. et al. Thermally Triggered Release of the Bacteriophage Endolysin CHAP(K) and the Bacteriocin Lysostaphin for the Control of Methicillin Resistant Staphylococcus Aureus (MRSA). **J. Control. Release**, p. 108-115, 2017.
80. LI, W. et al. Microfluidic Fabrication of Microparticles for Biomedical Applications. **Chem. Soc. Rev**, p. 5646-5683, 2018.
81. ZHAO, M. et al. Abraxane, the Nanoparticle Formulation of Paclitaxel Can Induce Drug Resistance by Up-Regulation of P-Gp. **PLoS ONE**, v. 10, 2015.
82. PAPI, M. et al. Converting the Personalized Biomolecular Corona of Graphene Oxide Nanoflakes into a High-Throughput Diagnostic Test for Early Cancer Detection. **Nanoscale**, p. 15339-15346, 2019.
83. ROBINSON, E. et al. Lipid Nanoparticle-Delivered Chemically Modified mRNA Restores Chloride Secretion in Cystic Fibrosis. **Mol. Ther.**, p. 2034-2046, 2018.
84. MI, S. et al. Three-Dimensional Microfluidic Tumor–Macrophage System for Breast Cancer Cell Invasion. **Biotechnol. Bioeng**, p. 1731-1741, 2019.
85. YI, Y. et al. Central Nervous System and Its Disease Models on a Chip. **Trends Biotechnol**, p. 762-776, 2015.

86. LI, K. et al. Biomimetic Human Lung-on-a-Chip for Modeling Disease Investigation. **Biomicrofluidics**, 2019.
87. KANABEKOVA, P.; KADYROVA, A.; KULSHAROVA, G. Microfluidic Organ-on-a-Chip Devices for Liver Disease Modeling In Vitro. **Micromachines**, 2022.
88. COLUCCIO, M. L. et al. Microfluidic Platforms for Cell Cultures and Investigations. **Microelectron Eng.**, p. 14-28, 2019.
89. WARRICK, J. W.; MURPHY, W. L.; BEEBE, D. J. Screening the Cellular Microenvironment: A Role for Microfluidics. **IEEE Rev. Biomed. Eng**, p. 75-93, 2008.
90. UTOH, R. et al. Polyanion-Induced, Microfluidic Engineering of Fragmented Collagen Microfibers for Reconstituting Extracellular Environments of 3D Hepatocyte Culture. **Mater. Sci. Eng. C**, 2021.
91. ZARRINTAJ, P. et al. uman Organs-on-Chips: A Review of the State-of-the-Art, Current Prospects, and Future Challenges. **Adv. Biol.**, 2022.
92. SHIN, W. et al. Human Intestinal Morphogenesis Controlled by Transepithelial Morphogen Gradient and Flow-Dependent Physical Cues in a Microengineered Gut-on-a-Chip. **iScience**, p. 391-406, 2019.
93. ZHAO, Y. et al. Engineering Microenvironment for Human Cardiac Tissue Assembly in Heart-on-a-Chip Platform. **Matrix Biol**, p. 189-204, 2020.
94. COX, B. et al. Setup of Human Liver-Chips Integrating 3D Models, Microwells and a Standardized Microfluidic Platform as Proof-of-Concept Study to Support Drug Evaluation. **Biomater Biosyst.**, 2022.
95. KEFALLINO, D. et al. Fabrication of a 3D Microfluidic Cell Culture Device for Bone Marrow-on-a-Chip. **Micro Nano Eng**, 2020.

96. KIM, H. et al. Effect of Shear Stress on the Proximal Tubule-on-a-Chip for Multi-Organ Microphysiological System. **J. Ind. Eng. Chem**, p. 279-286, 2022.
97. KHALID, M. A. U. et al. Lung Cancer-on-Chip Platform with Integrated Biosensors for Physiological Monitoring and Toxicity Assessment. **Biochem. Eng J.**, 2020.
98. PEDIADITAKIS, I. et al. A Microengineered Brain-Chip to Model Neuroinflammation in Humans. **iScience**, 2022.
99. CAMPAÑA, A. L. et al. Enzyme-Based Electrochemical Biosensors for Microfluidic Platforms to Detect Pharmaceutical Residues in Wastewater. **Biosensors**, 2019.
100. LIU, X. et al. Electrochemical/Visual Microfluidic Detection with a Covalent Organic Framework Supported Platinum Nanzyme-Based Device for Early Diagnosis of Pheochromocytoma. **Biosens. Bioelectron**, 2022.
101. LIN, Q. et al. Microfluidic Immunoassays for Sensitive and Simultaneous Detection of IgG/IgM/Antigen of SARS-CoV-2 within 15 Min. **Anal. Chem**, p. 9454-9458, 2020.
102. BASIRI, A. . H. A. . N. M. F. . F. M. T. P. . N. S. S. . S. M. . S. A. . R. N. Microfluidic devices for detection of RNA viruses. **Wiley**, p. 20, abril 2020.
103. ADELINA-GABRIELA NICULESCU, C. C. A. C. B. A. M. G. Fabrication and Applications of Microfluidic Devices: A Review. **International Journal of Molecular Sciences**, fevereiro 2021.
104. ZEHAO CHEN, Z. L. Z. Z. D. A. W. H. Z. Y. Z. W. C. Advanced microfluidic devices for fabricating multi-structurallyhydrogel microsphere. **Exploration**, novembro 2021.
105. SCOTT, S. M. . A. Z. Fabrication Methods for Microfluidic Devices: An Overview. **Micromachines**, março 2021.

106. DAMODARA, S. . S. S. . W. W. . R. P. . H. H. . S. R. Materials and Methods for microfabrication of microfluidic devices. In: XIUJUN LI, Y. Z. **Microfluidic Devices for Biomedical Applications**. 2^a. ed. [S.l.]: Elsevier Ltd, 2021. Cap. 1, p. 681.
107. METZ, S. . J. S. . B. D. . R. P. . Polyimide and SU-8 microfluidic devices manufactured by heat-devolymizerizable sacrificial material technique. **Lab on a Chip**, p. 114-120, 2004.
108. AGIRREGABIRIA, M. . E. A. Fabrication of SU-8 multilayer microstructures based on successive CMOS compatible adhesive bonding and releasing steps. **Lab on Chip**, p. 545-552, 2005.
109. DYKES, J. M. E. A.. Creation of embedded structures in SU-8. **Proceedings of SPIE**, 2007.
110. MARTINEZ, P. R. . B. A. W. G. S. The history, developments and opportunities of stereolithography. In **3D printing of pharmaceuticals** , p. 55-79, 2018.
111. RIHAKOVA, L. . C. H. Laser micromachining of glass, silicon and ceramics. A review. **European International Journal of Science and Technology**, p. 41-49, 2015.
112. LAKSHMINARAYANA, S. Micro/nano patterning on polymers using soft lithography technique. **Micro/nanolithography: A Heuristic Aspect on the Enduring Technology**, 2018.
113. GALE, B. K. . J. A. R. . L. C. J. . G. B. L. . M. H. . N. U. C. . E. A. A review of current methods in microfluidic device fabrication and future commercialization prospects. **Inventions**, 2018.
114. ATTIA, U. M. . A. J. R. A review of micro-powder injection moulding as a microfabrication technique. **Journal of Micromechanics and Microengineering**, 2011.

115. CHEN, J. et al. nanotechnology-Assisted Isolation and Analysis of Circulating Tumor Cells on Microfluidic Devices. **Micromachines**, v. 11(8), p. 774, Agosto 2020.
116. CHENG, J. et al. Nanotechnology-Assisted Isolation and Analysis of Circulating Tumor Cells on Microfluidic Devices. **Micromachines**, v. 11, p. 774, 2020.
117. HAROUAKA, R.; NISIC, M.; ZHENG, S. Circulating tumor cell enrichment based on physical properties. **J. Lab. Autom**, v. 18, p. 455-468, 2013.
118. SHAPIRO, H. M. et al. Combined blood cell counting and classification with fluorochrome stains and flow instrumentation. **Cytochem**, v. 24, p. 396-401, 1976.
119. IZABELA, D.; ELZBIETA, S.; ZBIGNIEW, A. F. Changes in Electric Properties of Human Breast Cancer Cells. **J. Membr. Biol**, v. 246, p. 161-166, 2013.
120. ZHAO, Y. et al. Tumor cell characterization and classification based on cellular specific membrane capacitance and cytoplasm conductivity. **Biosens. Bioelectron**, v. 57, p. 245-253, 2014.
121. SULTAN KHETANI, M. M. A. S. N. Filter-based isolation, enrichment, and characterization of circulating tumor cells. **Biotechnol Bioeng.**, v. 115, p. 2504-2529, Agosto 2018.
122. PETER WILDING, L. J. K. J. C. P. F. Integrated Cell Isolation and Polymerase Chain Reaction Analysis Using Silicon Microfilter Chambers. **Analytical Biochemistry**, v. 257, p. 95-100, março 1998.
123. YOON-TAE KANG, I. D. J. B. H. J. C. Y.-H. C. Label-free Rapid Viable Enrichment of Circulating Tumor Cell by Photosensitive Polymer-based Microfilter Device. **Theranostics** , v. 7, p. 3179-3191, 2017.

124. LIU C, Q. X. O. S. C. D. C. Z. A. W. M. D. C. P. B. H. A timer-actuated immunoassay cassette for detecting molecular markers in oral fluids. **Lab Chip**, v. 9, p. 768-776, 2009.
125. CHAO JIN, S. M. M. S. P. D. X. D. P. T. P. C. B. H. M. Technologies for label-free separation of circulating tumor cells: from historical foundations to recent developments. **Lab on a Chip**, v. 14, p. 32, 2014.
126. ROHOLLAH NASIRI, A. S. S. A. L. A. J. A. J. G. K. L. N. A. M. R. D. D. C. A. A. K. Microfluidic-Based Approaches in Targeted Cell/Particle Separation Based on Physical Properties: Fundamentals and Applications. **Small**, v. 16, p. 1-17, 2020.
127. DESCAMPS, L. **Self-assembled permanent micro-magnets for the isolation of Circulating Tumor Cells in a microfluidic device**. Université de Lyon. [S.l.], p. 199. 2021. (: 2021LYSE1253ff.).
128. LOTIEN RICHARD HUANG, E. C. C. R. H. A. A. J. C. S. Continuous Particle Separation Through Deterministic Lateral Displacement. **Science**, v. 304, p. 987-990, maio 2004.
129. PINCHED Flow Fractionation: Continuous Size Separation of Particles Utilizing a Laminar Flow Profile in a Pinched Microchannel. **Analytical Chemistry**, v. 76, p. 5465-5471, agosto 2004.
130. KALYAN S, T. C. K. H. S. H. C. S. W. W. T. B. K. D. H. S. Inertial Microfluidics Enabling Clinical Research. **Micromachines (Basel)**, v. 12, p. 257, março 2021.
131. JACKSON, J. M. et al. Materials and Microfluidics: Enabling the Efficient Isolation and Analysis of Circulating Tumour Cells. **Chem. Soc. Rev.**, v. 46, p. 4245-4280, 2017.
132. HUGHES, M. P. Strategies for dielectrophoretic separation in laboratory-on-a-chip systems. **ELECTROPHORESIS**, v. 23, p. 2569-2582, agosto 2002.

133. DEBANJAN DAS, K. B. S. D. A microfluidic device for continuous manipulation of biological cells using dielectrophoresis. **Medical Engineering & Physics**, v. 36, junho726-731 2014.
134. GOURDIN, T.; SONPAVDE, G. Utility of cell-free nucleic acid and circulating tumor cell analyses in prostate cancer. **Asian J. Androl**, v. 20, p. 230-237, 2018.
135. CHO, H. et al. Microfluidic technologies for circulating tumor cell isolation. **Analyst**, v. 143, p. 2936-2970, 2018.
136. YU, M. et al. Circulating breast tumor cells exhibit dynamic changes in epithelial and mesenchymal composition. **Science**, v. 339, p. 580-584, 2013.
137. BRIAN D PLOUFFE, S. K. M. A. L. H. L. Fundamentals and application of magnetic particles in cell isolation and enrichment: a review, v. 78, dezembro 2014.
138. ARASH DALILI, E. S. M. H. A review of sorting, separation and isolation of cells and microbeads for biomedical applications: microfluidic approaches. **Analyst**, v. 144, p. 87-113, 2019.
139. J.-C. YU, C.-C. H. W.-H. C. P.-C. C. M. S. L. K.-T. P. G.-B. L. An integrated microfluidic system using mannose-binding lectin for bacteria isolation and biofilm-related gene detection. **Microfluid. Nanofluid**, v. 22, p. 13, 2018.
140. WU, W. . M. A. B. . G. A. E. A. Design of microfluidic channels for magnetic separation of malaria-infected red blood cells. **Microfluid Nanofluid**, v. 20, p. 41, 2016.
141. HANYUE KANG, Y. X. L. M. T. Y. X. X. Recent advances in micro-/nanostructure array integrated microfluidic devices for efficient separation of circulating tumor cells, v. 12, p. 34892-34903, 2022.

142. YIYANG LIU, Y. W. S. S. Z. C. S. X. Z. D. Z. H. B. Z. Understanding the versatile roles and applications of EpCAM in cancers: from bench to bedside. **Experimental Hematology e Oncology**, v. 11, p. 97, novembro 2022.
143. PAVSIC M, G. G. D.-C. K. L. B. Crystal structure and its bearing towards an understanding of key biological functions of EpCAM. **Nat Commun**, v. 5, p. 4764, 2014.
144. HARMSSEN, M. T. . P. M. J. M. . L. M. F. H. D. L. . M. C. Epithelial Cell Adhesion Molecule- More than a Carcinoma Marker and Adhesion Molecule. **The American Journ of Patology** , v. 171, p. 386-395, agosto 2007.
145. BROWN, T. C.; SANKPAL, N. V.; GILLANDERS, W. E. Functional Implications of the Dynamic Regulation of EpCAM during Epithelial-to-Mesenchymal Transition. **Biomolecules** , v. 11, p. 956, 2021.
146. EYVAZI, S. et al. Antibody Based EpCAM Targeted Therapy of Cancer, Review and Update. **Curr. Cancer Drug Targets**, v. 18, p. 857-868, 2018.
147. LIU Y, L. Q. C. T. S. T. Z. X. S. P. E. A. Clinical verification of vimentin/EpCAM immunolipid magnetic sorting system in monitoring CTCs in arterial and venous blood of advanced tumor. **J Nanobiotechnol**, v. 19, p. 185, 2021.
148. ONIDANI K, S. H. K. T. Y. S. O. S. M. N. E. A. Monitoring of cancer patients via next-generation sequencing of patient-derived circulating tumor cells and tumor DNA. **Cancer Sc**, v. 110, p. 2590-2599, 2019.
149. SZCZERBA, B. M. . C.-G. F. . V. M. . K. I. . G. S. . L. J. . S. M. C. . D. C. . S. R. . S. J. . B. C. . K. C. . H.-S. V. . R. C. . W. W. P. . B. N. . & A. N. Neutrophils escort circulating tumour cells to enable cell cycle progression. **Nature**, v. 566, p. 553-557, 2019.
150. BOSCH, R. . P. B. . M. N. P. . S.-L. K. . M. P. **Enrichment and molecular analysis of circulating tumor**. Medizinische Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen. [S.l.], p. 191. 2024.

151. GOLD, M. . P. K. . K. A. . & S. R. Monitoring of circulating epithelial tumor cells using the Maintrac® method and its potential benefit for the treatment of patients with colorectal cancer. **Mol Clin. Oncol**, v. 15, p. 201, 2021.
152. VONA G, S. A. L. M. S. V. R. S. S. K. C. F. F. D. P. M. V. M. L. B. B. C. P.-B. P. Isolation by size of epithelial tumor cells : a new method for the immunomorphological and molecular characterization of circulating tumor cells. **Am J Pathol**, v. 156, p. 57-63, 2000.
153. LI C, H. W. W. N. X. Z. D. R. L. X. K. R. X. L. L. X. Application of Microfluidics in Detection of Circulating Tumor Cells. **Front. Bioeng. Biotechnol.**, v. 10, 2022.
154. KÖNIGSBERG, R. . O. E. . B. G. . P. G. . G. M. . W. F. D. C. Detection of EpCAM positive and negative circulating tumor cells in metastatic breast cancer patients. **Acta Oncologica**, v. 50, n. 5, p. 700-710, 2011.
155. KURASHINA, Y. . I. C. . H. M. E. A. Enzyme-free release of adhered cells from standard culture dishes using intermittent ultrasonic traveling waves. **Commun Biol** , v. 2, p. 393, 2019.
156. KAGAN M, H. D. B. T. E. A. A sample preparation and analysis system for identification of circulating tumor cells, v. 25, p. 101-110, 2002.
157. FUNDAÇÃO CENTRO DE CONTROLE DE ONCOLOGIA DO ESTADO DO AMAZONAS. Câncer. Disponível em: <<https://www.fcecon.am.gov.br/cancer/>>. Acesso em: 28 novembro 2024.
158. INTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. Neoplasia maligna do sistema nervoso central (taxas brutas). **Ministério da Saúde**, 2022. Disponível em: <<https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/numeros/estimativa/por-neoplasia-taxas-brutas/sistema-nervoso-central>>. Acesso em: 28 novembro 2024.

159. KIM, Y.-H. et al. An RNA Aptamer That Specifically Binds Pancreatic Adenocarcinoma Up-Regulated Factor Inhibits Migration and Growth of Pancreatic Cancer Cells. **Cancer Lett**, p. 76-83, 2011.
160. WELLER, M. E. A. ANO guidelines on the diagnosis and treatment of adult astrocytic and oligodendroglial gliomas. **The Lancet Oncology**, v. 22, n. 7, p. 281-294, 2021.