

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
CAMPUS BOTUCATU**

MARIA BEATRIZ PICCELLI PATERNO

**ESTUDO DA VIABILIDADE E PARÂMETROS OPERACIONAIS DO
OSTEOSSARCOMA CANINO EM CHIP MICROFLUÍDICO**

**Botucatu, São Paulo
2025**

MARIA BEATRIZ PICCELLI PATERNO

**ESTUDO DA VIABILIDADE E PARÂMETROS OPERACIONAIS DO
OSTEOSSARCOMA CANINO EM CHIP MICROFLUÍDICO**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao curso de Física Médica da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Instituto de Biociências de Botucatu como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Física Médica.

Orientador: Prof. Assistente Rogerio Antonio Oliveira
Co-orientador: Discente de Doutorado Carlos Mario Gonzalez Zambrano

Botucatu, São Paulo
2025

P295e

Paterno, Maria Beatriz Piccelli

ESTUDO DA VIABILIDADE E PARÂMETROS OPERACIONAIS DO
OSTEOSSARCOMA CANINO EM CHIP MICROFLUÍDICO / Maria

Beatriz Piccelli Paterno. -- Botucatu, 2025

29 p.

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Física Médica) -
Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Botucatu

Orientador: Rogério Antonio De Oliveira

Coorientador: Carlos Mario Gonzalez Zambrano

1. Adesão Celular. 2. PDMS. 3. Organ-on-Chip. 4. Osteossarcoma canino.

I. Título.

MARIA BEATRIZ PICCELLI PATERNO

**ESTUDO DA VIABILIDADE E PARÂMETROS OPERACIONAIS DO
OSTEOSSARCOMA CANINO EM CHIP MICROFLUÍDICO**

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª. Miriam Harumi Tsunemi
Instituto de Biociências de Botucatu (IBB), UNESP

Dr^ª. Mirian Carolini Esgoti Aal
Instituto de Biociências de Botucatu (IBB), UNESP

Prof. Rogerio Antonio de Oliveira
Instituto de Biociências de Botucatu (IBB), UNESP

Dedico este trabalho às minhas avós:
Celia Lembo, Idalina Silveira (*in memoriam*) e Jacira do Carmo (*in memoriam*).

Agradecimentos

Agradeço aos meus pais, Lilian e Antonio Carlos, por todo suporte, amor, educação e, que mesmo debaixo de muito sol, nunca deixaram me faltar sombra. Ao Daniel, por todo zelo, amor, carinho, paciência e suporte nos momentos difíceis.

Ao meu orientador, Professor Rogério, por ter acreditado e confiado em mim, pelas diversas conversas e conselhos.

Ao Carlos e ao LIAI, por terem feito esse projeto se tornar realidade.

À Fernanda Barthelson e ao Guilherme Sousa, pela ajuda e por fazerem acontecer.

À toda minha família, por todo apoio.

À minha prima, Maria Fernanda, por todas as conversas, risadas e fofocas antes de dormir.

À Monalisa e Maria Loísa, e às suas famílias, pelo apoio, momentos de risada e viagens inesquecíveis.

À Rosangela e Cláudia, pelo acolhimento, suporte em uma cidade nova e todos os sonhos quentinhos comidos.

À Dayane, obrigada por ter contribuído muito mais que 0,0001% do que sou.

Às meninas Sarah, Karine e Alanis, vocês são imensuráveis, ter vocês ao meu lado fizeram todo esses anos terem valido a pena e sidos mais leves.

À Beatriz Almeida, por ter sido fundamental nessa etapa final da graduação.

À Professora Flávia Delella e ao ICBLab, por terem me mostrado como a ciência pode e é incrível.

Aos professores da Física Médica por todo conhecimento passado.

À Seção de Graduação, por toda paciência em responder todas as dúvidas e sempre ajudarem, e a todos os funcionários do Instituto de Biociências.

“Devemos acreditar que somos talentosos para algumas coisas,
e que essas coisas, a qualquer custo, devem ser alcançadas.” Marie Curie.

RESUMO

O osteossarcoma (OSA) é a neoplasia óssea primária mais comum em cães de grande porte, caracterizada por alta agressividade e elevada taxa de metástase pulmonar. Este estudo teve como objetivo desenvolver um chip microfluídico em PDMS para o cultivo de células de OSA canino, avaliando viabilidade celular e os e parâmetros operacionais. Foram projetados e fabricados diferentes protótipos, mas os testes indicaram baixa adesão e ausência de expansão celular no chip, em contraste com a cultura convencional. As limitações observadas estão relacionadas às propriedades físico-químicas do PDMS, como a alta hidrofobicidade e a rugosidade não otimizada, que dificultam a interação célula-superfície. Estratégias, como tratamentos de superfície e o uso de biomateriais alternativos, como hidrogéis, são apontadas como soluções promissoras para mimetizar a matriz extracelular e melhorar a funcionalidade dos dispositivos. Contudo, é necessário padronizar processos, avaliar as técnicas utilizadas e realizar replicações experimentais para garantir a consistência e a confiabilidade dos resultados. Em síntese, a integração entre *design* estrutural, modificação físico-química e escolha adequada de biomateriais é essencial para consolidar a tecnologia “Organ-on-Chip” como ferramenta translacional em pesquisas oncológicas, com potencial para estudos de metástase e desenvolvimento de terapias direcionadas.

Palavras-chave: Osteossarcoma canino; “Organ-on-Chip”; PDMS, Adesão Celular.

ABSTRACT

Osteosarcoma (OSA) is the most common primary bone neoplasm in large-breed dogs, characterized by high aggressiveness and a significant rate of pulmonary metastasis. This study aimed to develop a PDMS-based chip for culturing canine OSA cells, assessing cell viability, and operational parameters. Several prototypes were *designed* and fabricated, but tests revealed poor adhesion and a lack of cell expansion within the chip, in contrast to conventional culture conditions. The limitations observed are linked to the physicochemical properties of PDMS, such as high hydrophobicity and non-optimized roughness, which hinder cell-surface interactions. Strategies such as surface treatments and the use of alternative materials, such as hydrogels, are considered promising for mimicking the extracellular matrix and improving device functionality. However, standardization of processes, evaluation of applied techniques, and experimental replication are essential to ensure consistency and reliability of results. In summary, integrating structural *design*, chemical modification, and appropriate material selection is crucial to establishing “Organ-on-Chip” technology as a translational tool in oncology research, with potential applications in metastasis studies and targeted therapy development.

Keywords: Canine osteosarcoma; “Organ-on-Chip”; PDMS; Cell adhesion.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: <i>Design</i> 2D do projeto do chip microfluídrico.....	4
Figura 2: <i>Design</i> 3D do molde do chip microfluídrico em vista ortogonal.....	5
Figura 3: <i>Design</i> 3D do molde dos microcanais em vista ortogonal.....	5
Figura 4: <i>Design</i> 3D do chip microfluídrico em vista ortogonal.....	5
Figura 5: <i>Design</i> 3D do chip em corte de inspeção para visualização das câmaras.	6
Figura 6: Máquina de impressão 3D utilizada para imprimir os moldes.	6
Figura 7: Equipamento utilizado para cura UV.	7
Figura 8: PDMS e Agente Reticulante.....	7
Figura 9: Câmara desgaseificadora.	8
Figura 10: Câmara de plasma de ozônio.	8
Figura 11: Primeiro modelo de molde.	9
Figura 12: Chips após desenformar.	10
Figura 13: Molde do segundo chip.....	10
Figura 14: Terceiro molde do chip.	11
Figura 15: Células de osteossarcoma canino viáveis.....	12
Figura 16: Células no chip em T0.	12
Figura 17: Células no chip em T1.	13
Figura 18: Comparação das células no chip (A) com as células da garrafa (B), em T2.....	13
Figura 19: Comparação das células no chip (A) com as células da garrafa (B), em T3.....	14
Figura 20: Teste com Azul de Tripán para verificar a viabilidade das células após 24h.	14

Sumário

1. Introdução	1
2. Objetivos.....	3
2.1. Objetivos Específicos.....	3
3. Materiais e Métodos	3
3.1. Materiais.....	3
3.1.1. Origem das células tumorais e autenticação.....	3
3.1.2. Criopreservação dos cultivos primários.....	3
3.2. Métodos	4
3.2.1. Cultivo das células de OSA	4
3.2.2. Projeto do chip.....	4
4. Resultados	9
4.1. Simulação e resultado do chip	9
4.2. Cultura celular no chip	11
5. Discussão	14
6. Conclusão	16
Referências	16

1. Introdução

O osteossarcoma (OSA) é a neoplasia óssea primaria mais comum em cães de grande porte, com pico de incidência entre 5 e 9 anos. Por ser altamente agressiva, aproximadamente 80% dos casos são tumores malignos e 90% das metástases ocorrem no pulmão. Essa neoplasia apresenta um comportamento altamente agressivo e alta taxa de mortalidade, mesmo diante dos avanços terapêuticos. A amputação continua sendo o tratamento mais indicado, porém não garante sobrevida prolongada (Kim *et al.*, 2016; Morello *et al.*, 2011).

Existem semelhanças clínicas e biológicas significativas entre o OSA canino e humano, o que posiciona o modelo canino como essencial para a patologia comparada (Fenger *et al.*, 2020). Em ambas as espécies, este tumor se destaca pela rápida progressão, frequentemente desenvolvida de metástases e prognóstico reservado (Morello *et al.*, 2021, Romanucci *et al.*, 2023).

A reprodução fidedigna do microambiente tumoral (TME) em modelos convencionais de cultura celular 2D e ensaios pré-clínicos apresenta bastante desafios, limitando a compreensão da complexidade das interações celulares. Para superar essas limitações, a tecnologia de “Organ-on-Chip” (OoC) surge como uma alternativa promissora. Esses dispositivos simulam microambientes tridimensionais sob condições controladas, fornecendo uma plataforma tridimensional *in vitro* semelhante ao organismo de um ser vivo, porém, permitindo o controle de diversos parâmetros físico-químicos e biológicos, simulando as condições fisiológicas naturais (Regmi *et al.*, 2022; Yu *et al.*, 2023).

Essa precisão no controle ambiental possibilita a recriação de parâmetros físico-químicos e biológicos essenciais, fornecendo uma plataforma *in vitro* superior para o estudo realista de interações celulares e a replicação do microambiente tumoral (Regmi *et al.*, 2022; Yu *et al.*, 2023). A evolução dessa tecnologia teve um marco inicial em 2004, com a demonstração de um sistema análogo de cultura de células (CCA) que mostrava a interação sistêmica entre o pulmão e o fígado em um chip de silício que tinha aproximadamente 6,5 cm² (Zhang *et al.*, 2018).

Desde então, o campo avançou rapidamente, e em 2010 o termo “Organ-on-Chip” foi inventado (Zhang *et al.*, 2018) e vários modelos de dispositivos microfluídicos foram desenvolvidos e testados, imitando as mais diferentes funções biológicas do corpo humano por meio do cultivo de células de vasos sanguíneos, músculos, ossos, fígado, cérebro, entre outros (Zhang *et al.*, 2018).

O principal foco do OoC é a simulação de três aspectos-chave da fisiologia: interfaces teciduais multicelulares, organização celular em nível de órgão e interações sistêmicas entre múltiplos órgãos (Zhang *et al.*, 2018). O *design* desses chips, que incorpora fluxos controlados, gradientes de concentração estáveis e estímulos mecânicos dinâmicos, amplia as possibilidades de estudo. Esses sistemas integram múltiplos canais, câmaras e membranas, permitindo a avaliação de processos como a administração de fármacos, a toxicologia e as respostas imunológicas. Avanços recentes incluem plataformas multiorgânicas em um único chip, viabilizando o estudo das interações intertecido com menor interferência experimental e maior aplicabilidade translacional (Sharma *et al.*; Farhang *et al.*, 2024).

Nesse panorama, adaptações dessa tecnologia para modelos tumorais têm mostrado grande potencial em reproduzir gradientes químicos e interações dinâmicas entre células tumorais e imunológicas (Ashammakhi *et al.*, 2020; Avula & Grodzinski, 2024). Essa aplicação é extremamente importante para o OSA, no qual estudos indicam que células do sistema imune, como os neutrófilos, desempenham um papel paradoxal na progressão da doença (Yu *et al.*, 2023). Portanto, um modelo experimental, como o OoC, que capture essa complexidade é crucial para avanços terapêuticos, uma vez que possibilita a avaliação de fármacos até respostas imunológicas (Sharma *et al.*, Farhang *et al.*, 2024).

As interações entre o osteossarcoma e o sistema imunológico, especialmente com neutrófilos, têm sido reconhecidas como elementos centrais na modulação da invasividade tumoral e na formação de metástases (Axiak-Bechtel *et al.*, 2019; Tang *et al.*, 2024). Compreender essas dinâmicas celulares em um ambiente tridimensional pode fornecer informações cruciais para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas que combatam a progressão tumoral e melhorem os desfechos clínicos.

A aplicação de tecnologias como o “Organ-on-Chip” representa uma abordagem inovadora para simular as condições do microambiente tumoral de forma controlada e reprodutível (Ashammakhi *et al.*, 2020; Xu *et al.*, 2024). Além disso, os dados gerados de OSA em OoC carregam um potencial translacional dadas as notáveis semelhanças clinicopatológicas entre a doença canina e humana.

Essas descobertas podem ser utilizadas para desenvolver novas técnicas para retardar a metástase e melhorar a sobrevida de cães e serve como um modelo pré-clínico mais elaborado na oncologia humana. Portanto, essa abordagem oferece uma plataforma poderosa para avançar no combate a uma neoplasia notoriamente agressiva e desafiadora em ambas as espécies, sendo uma grande vantagem na medicina translacional.

2. Objetivos

Esse trabalho teve como objetivo desenvolver um modelo microfluídico baseado em “Organ-on-Chip” para o cultivo de células de osteossarcoma canino, permitindo compreender as complexas interações entre o osteossarcoma e o sistema imunológico.

2.1. Objetivos Específicos

1. Projetar a arquitetura do chip microfluídico com microcanais e câmaras celulares utilizando o *software* Autodesk Fusion 360.
2. Produzir um molde mestre utilizando impressão 3D (DPL- Digital Liquid Printing) para replicação do chip em PDMS.
3. Fabricar o chip em PDMS, garantindo a remoção de bolhas e a cura adequada do polímero.
4. Realizar tratamentos de ativação superficial (plasma de oxigênio e luz UV) para promover adesão entre PDMS e vidro.
5. Estabelecer protocolo de cultivo celular no chip, com avaliação da viabilidade e migração das células tumorais.

3. Materiais e Métodos

3.1. Materiais

3.1.1. Origem das células tumorais e autenticação

As células de osteossarcoma canino foram obtidas do repositório de células do Laboratório de Patologia Investigativa e Comparada da FMVZ-UNESP. Para garantir sua identidade e pureza, estas células foram previamente autenticadas por meio de imunohistoquímica e PCR. Além disso, sua caracterização fenotípica incluiu avaliação da expressão de proteínas específicas, como vimentina, citoqueratina, osteocalcina, e osteopontina, utilizando citometria de fluxo (FACS).

3.1.2. Criopreservação dos cultivos primários

Para criopreservação deste cultivo primário, efetuou-se procedimento de tripsinização das células em cultivo, a contagem e posteriormente ajustado o número de 2×10^6 células por mL. Em seguida, utilizando solução com 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma C 6164),

20% SFB e 70% de DMEM alta glicose com penicilina, estreptomicina e anfotericina-B. O material obtido foi distribuído homogeneamente e acondicionado em criotubos (Sarstedt 72.694.006), repousados por 24h em Freezer -80° C. Em seguida colocados e mantidos em botijão criogênico em nitrogênio líquido (-196°C).

3.2. Métodos

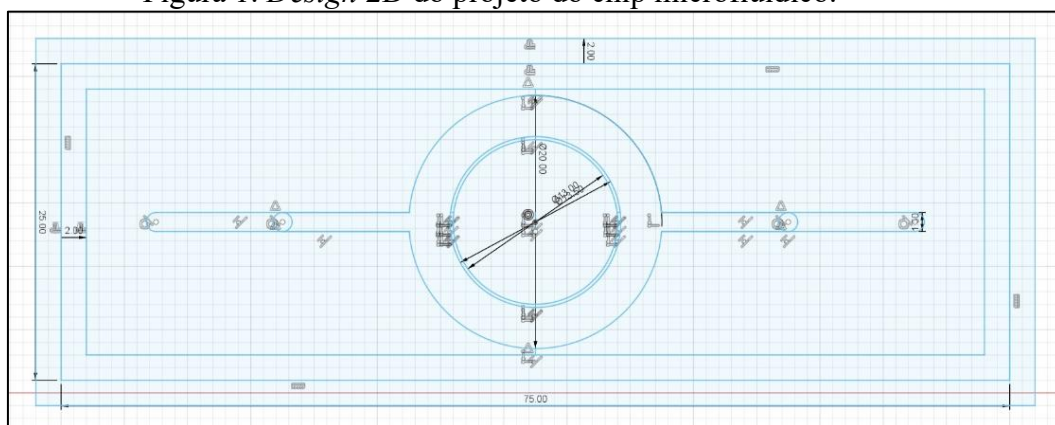
3.2.1. Cultivo das células de OSA

As células foram ressuspensas em meio de cultura Canine Endothelial Cell Media (Cell Applications, San Diego, CA, EUA), mais 20% de soro fetal bovino (FBS) (Sigma Aldrich, Missouri, EUA) e 1% de antibiótico (penicilina e estreptomicina) e gentamicina (anfoterapia micótica) (B) (GBICO, Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) e cultivada em 25 cm² flasks (SPL Life Sciences, Pocheon-si, Coréia). As células foram expandidas para passagens subsequentes, e as células de diferentes passagens foram armazenadas em nitrogênio líquido.

3.2.2. Projeto do chip

O *design* do chip microfluídico foi realizado utilizando a plataforma *online* Autodesk Fusion 360®, permitindo a modelagem precisa da arquitetura do dispositivo (Figura 1). A estrutura inclui microcanais e compartimentos específicos para o cultivo de células de osteossarcoma canino (Figura 2 , 3, 4 e 5).

Figura 1: *Design 2D* do projeto do chip microfluídico.



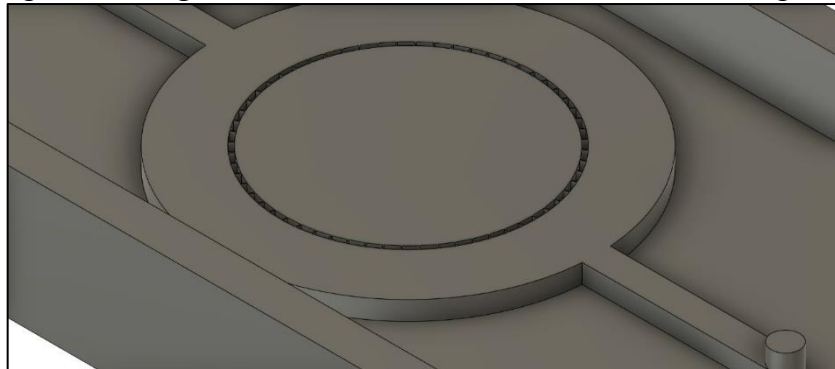
Fonte: Próprio autor.

Figura 2: *Design 3D* do molde do chip microfluídrico em vista ortogonal.



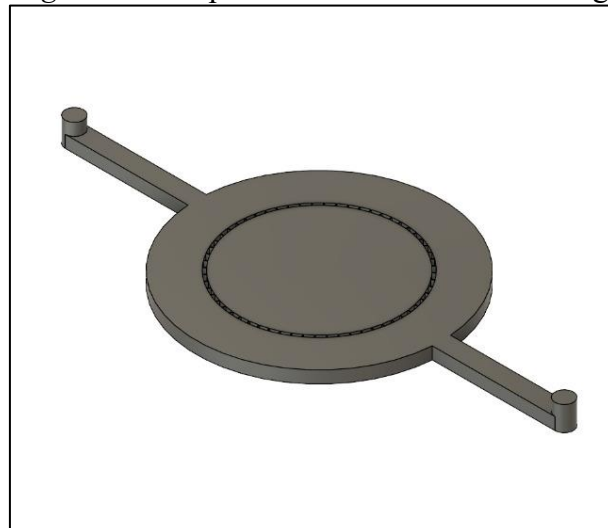
Fonte: Próprio autor.

Figura 3: *Design 3D* do molde dos microcanais em vista ortogonal.



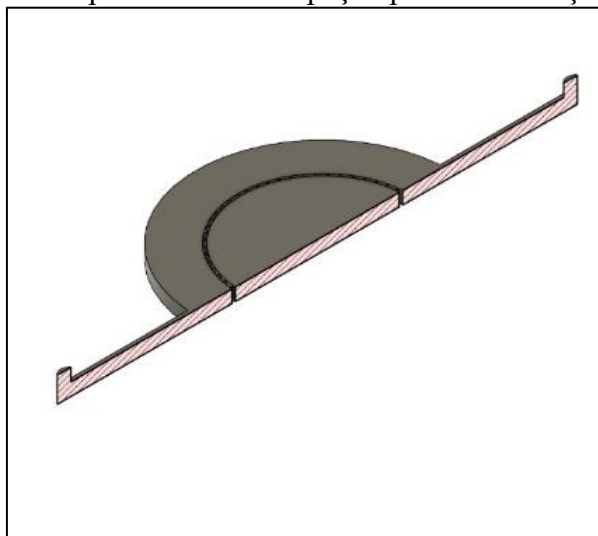
Fonte: Próprio autor.

Figura 4: *Design 3D* do chip microfluídrico em vista ortogonal.



Fonte: Próprio autor.

Figura 5: *Design* 3D do chip em corte de inspeção para visualização das câmaras.



Fonte: Próprio autor.

Finalizada a etapa de *design*, realizou-se a fabricação do molde mestre por meio de impressão 3D, utilizando a tecnologia SLA (Estereolitografia) ou DLP (Processamento Digital de Luz), devido à sua alta resolução e capacidade de reproduzir detalhes finos nos microcanais. Para esse processo, foi empregada uma impressora de alta precisão e resina especializada em microfluídica (Figura 6).

Figura 6: Máquina de impressão 3D utilizada para imprimir os moldes.



Fonte: Próprio autor.

Após a impressão, o molde passou por um pós-processamento que inclui lavagem com álcool isopropílico e cura com luz UV para garantir a estabilidade estrutural (Figura 7).

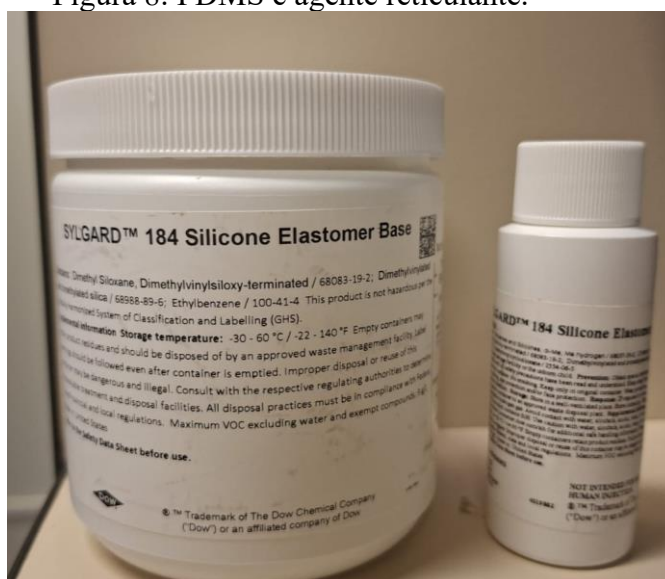
Figura 7: Equipamento utilizado para cura UV.



Fonte: Próprio autor.

A próxima etapa foi a fabricação do chip microfluídico com a modelagem em PDMS (Polidimetilsiloxano) (Figura 8). A mistura de PDMS, com seu agente reticulante, foi preparada em uma proporção adequada, seguida de uma homogeneização para evitar a formação de bolhas. Em seguida, a mistura foi vertida sobre o molde mestre e submetida a vácuo em uma câmara desgaseificadora (Figura 9), a fim de eliminar bolhas de ar aprisionadas no polímero. Posteriormente, o PDMS foi curado em uma estufa a 60° C por pelo menos 2 horas, assegurando sua completa solidificação.

Figura 8: PDMS e agente reticulante.



Fonte: Próprio autor.

Figura 9: Câmara desgaseificadora.



Fonte: Próprio autor.

Após a polimerização, o chip foi desmoldado e submetido a um processo de ativação superficial em uma câmara de plasma de ozônio (Figura 10), o que permitiu melhorar a adesão entre o PDMS e a lâmina de vidro. Além disso, foi aplicado um tratamento adicional com luz UV para otimizar a funcionalidade do sistema microfluídico.

Figura 10: Câmara de plasma de ozônio.



Fonte: Próprio autor.

3.2.3. Cultivo celular no chip

Na fase experimental, o chip passou por um processo de esterilização e foi submetido a o meio de cultura antes da sementeira de células de osteossarcoma canino. Foram estabelecidas condições controladas de fluxo para avaliar a migração celular, em resposta a diferentes estímulos. Finalmente, a viabilidade celular e o comportamento migratório das células dentro do chip foram analisados por meio de técnicas de microscopia.

Para a padronização do cultivo, foi avaliada a quantidade ideal de células de osteossarcoma canino a serem semeadas no chip microfluídico, garantindo condições adequadas para os experimentos de migração celular. Foram testadas em um volume de 200 μ L com concentrações distintas de células de osteossarcoma (2×10^4 , 5×10^4 e 10×10^4 células por chip).

Acompanhamentos periódicos foram realizados para determinar o tempo ideal de adesão e proliferação das células tumorais, bem como a melhor estratégia para a troca do meio de cultura. A viabilidade celular será avaliada em diferentes pontos temporais utilizando técnicas de coloração vital e microscopia. Esse processo permitirá estabelecer com precisão os parâmetros experimentais mais adequados para a próxima fase do estudo.

4. Resultados

4.1. Simulação e resultado do chip

O primeiro molde do chip microfluídico (Figura 11), simulado e impresso, apresentava 4,5ml de volume e duas câmaras, uma interna e outra externa, sendo a interna com microcanais de 0,5mm. O molde passou pelo processo de impressão, lavagem e cura com a luz UV.

Figura 11: Primeiro modelo de chip.



Fonte: Próprio Autor.

A etapa seguinte foi a fabricação do chip em PDMS, utilizando uma proporção de 90% de silicone e 10% de agente curador. No entanto, após 48h na estufa, o chip se rompeu no processo de desenformar (Figura 12), devido à pressão entre os microcanais, o que comprometeu a estrutura.

Figura 12: Chips após desenformar.



Fonte: Próprio autor.

Diante da falha apresentada no primeiro protótipo, foi necessário realizar ajustes e modificações para nova impressão. O segundo molde (Figura 13) manteve a mesma estrutura do primeiro com duas câmaras, porém com um aumento de 0,5mm na largura dos microcanais, visando a redução da pressão na hora de desenformar. Essas alterações fizeram com que o molde ficasse com 5,2ml de volume e o chip foi fabricado também com PDMS, porém com uma proporção de 85% de silicone e 15% de agente curador.

Figura 13: Molde do segundo chip.



Fonte: Próprio autor.

O terceiro molde (Figura 14) foi feito sem a câmara interna com o objetivo de evitar os problemas estruturais. O resultado foi um volume de 5ml e fabricado nas mesmas proporções de materiais que o segundo.

Figura 14: Terceiro molde do chip.



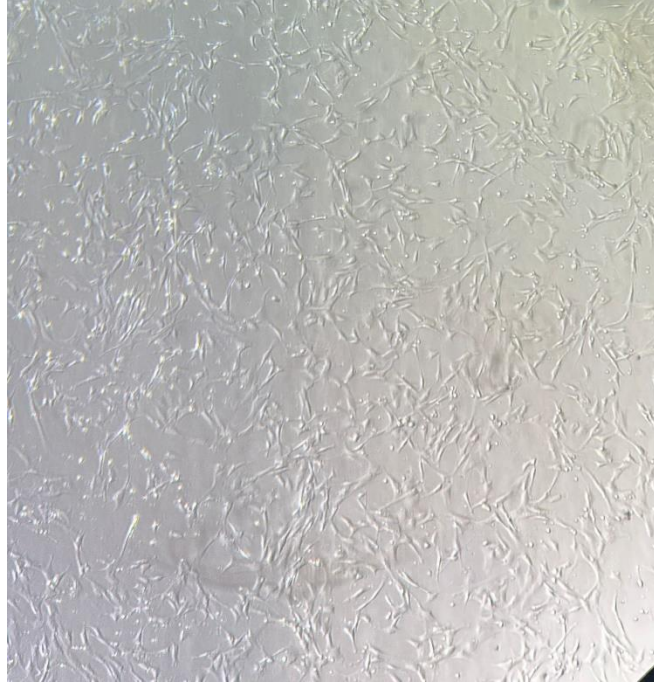
Fonte: Próprio autor.

Ao desenformar, o segundo chip apresentou o mesmo problema do primeiro, mesmo com o ajuste de tamanho dos microcanais, o que impossibilitou sua utilização e, conseqüentemente, a avaliação da migração celular. Já no terceiro modelo, foram produzidos três chips, porém dois apresentaram rasgos laterais ao desenformar devido ao espaço reduzido para inserção da pinça. Apenas um chip se manteve íntegro para ser utilizado nos testes da cultura celular. Nesse chip, utilizou-se a concentração de 10×10^4 células, conforme planejado para análise de viabilidade, não sendo possível os ensaios realizados com a quantidade de 2×10^4 e 5×10^4 .

4.2. Cultura celular no chip

Após a obtenção do chip que permaneceu intacto, foi realizada a cultura celular para avaliação a adesão e viabilidade das células de osteossarcoma canino no dispositivo microfluídrico. A concentração de células utilizadas foi de 10×10^4 , em um volume de 200 μL de meio de cultura celular, incubadas à 38°C.

Figura 15: Células de osteossarcoma canino viáveis.

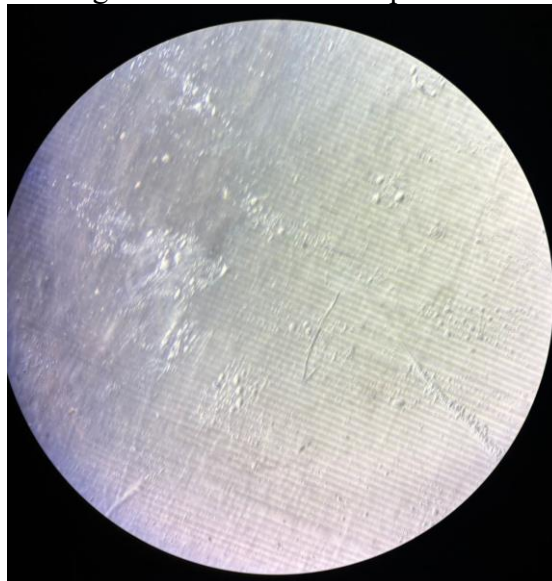


Fonte: Próprio autor.

As avaliações realizadas foram nos tempos 0h (T0), 4h (T1), 8h (T2) e 24h (T3) por meio de avaliação microscópica para verificar a adesão e expansão celular.

Durante o acompanhamento foi possível observar no tempo T0 (Figura 16) que as células aparentavam estar viáveis e distribuídas pelo meio.

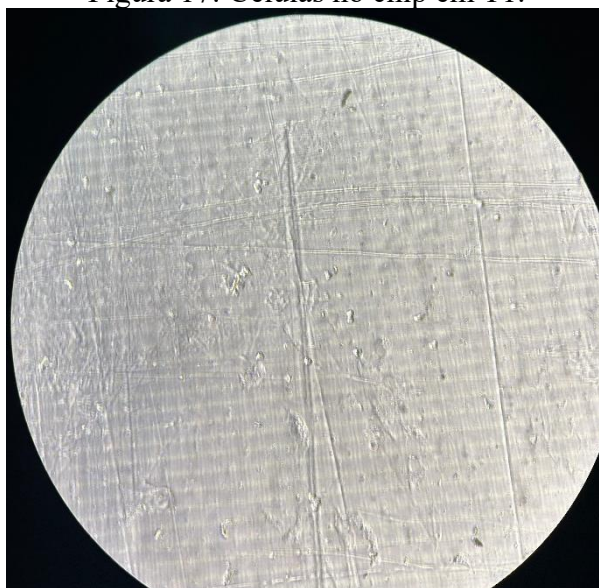
Figura 16: Células no chip em T0.



Fonte: Próprio autor.

Em T1 (Figura 17), as células começaram a se agrupar nas ranhuras do PDMS, sem aderência uniforme.

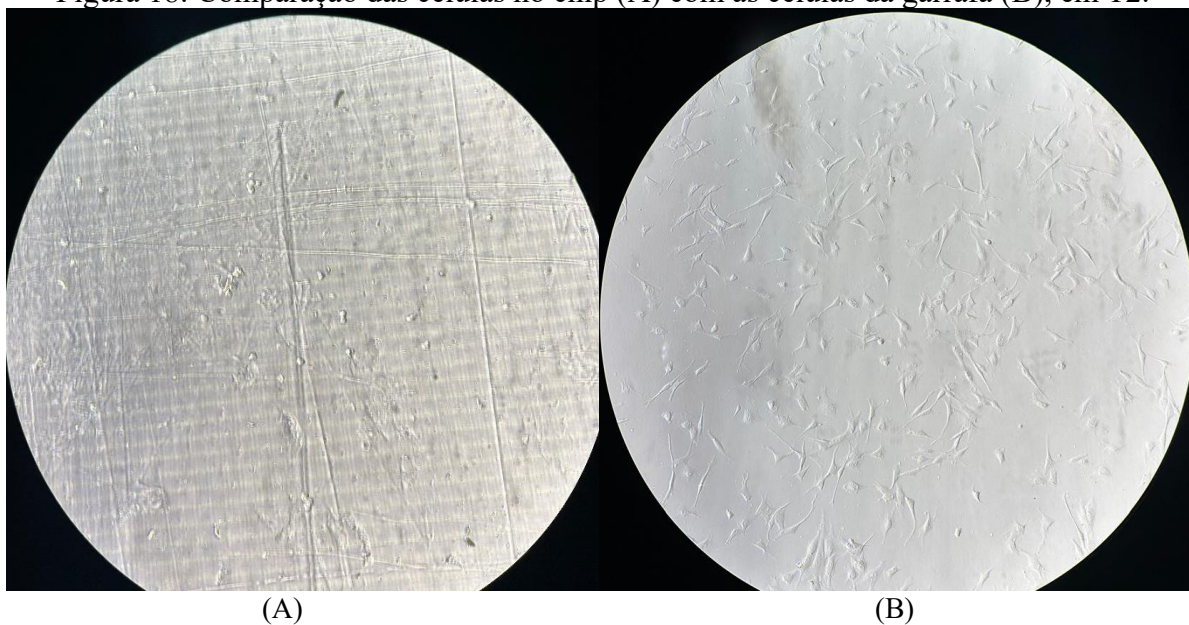
Figura 17: Células no chip em T1.



Fonte: Próprio autor.

No segundo tempo (T2) (Figura 18 A), havia um número muito reduzido de células aderidas, quando comparada com as células da cultura celular convencional (Figura 18 B) enquanto a maior parte estava solta, com sinais de morte celular.

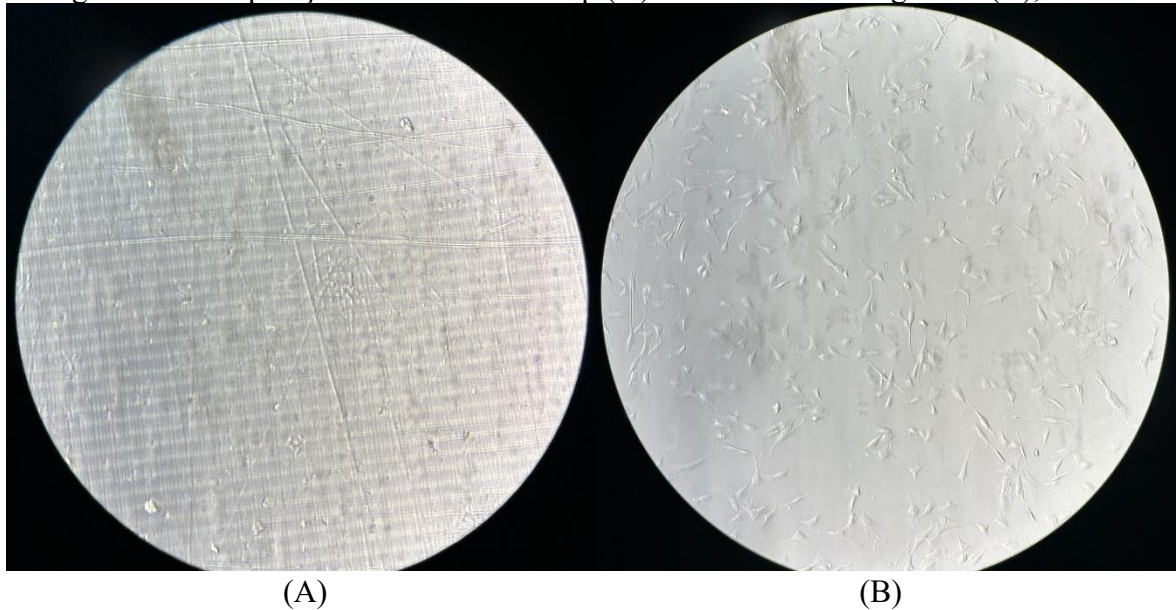
Figura 18: Comparação das células no chip (A) com as células da garrafa (B), em T2.



Fonte: Próprio autor.

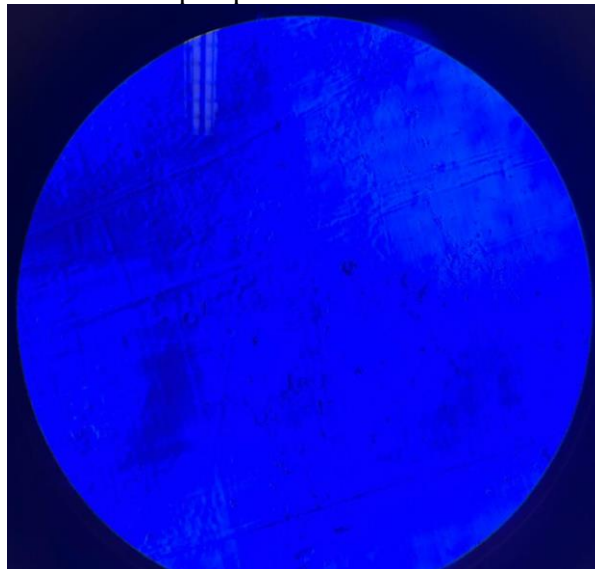
No último tempo apresentado (T3) (Figura 19 A), após verificar que realmente não houve adesão e expansão celular, enquanto as células da garrafa de cultura estavam em expansão (Figura 19 B) foi realizado o teste de viabilidade com Azul de Tripan (Figura 20), confirmando a ausência de células viáveis no chip.

Figura 19: Comparação das células no chip (A) com as células da garrafa (B), em T3.



Fonte: Próprio autor.

Figura 20: Teste com Azul de Tripán para verificar a viabilidade das células após 24h.



Fonte: Próprio autor.

5. Discussão

Os resultados obtidos demonstram que, mesmo com uma otimização no *design*, outros fatores ainda interfeririam no processo. Esse resultado se põe ao visualizado na cultura convencional, onde as células de osteossarcoma, nas mesmas condições de incubação e tempo, apresentam adesão e expansão. Algumas características físico-químicas do PDMS, implicam uma alta dificuldade de fixação celular no chip (Da Silveira *et al.*, 2020; Majhy *et al.*, 2021).

Essas características influenciam diretamente a interação célula-superfície. A alta hidrofobicidade do PDMS permite com que ele tenha uma baixa energia superficial, ou seja, pouca capacidade de formar ligações com moléculas polares, como a água e as proteínas da matriz extracelular. Sem essas ligações, a água é repelida. Assim não é possível a absorção das proteínas da matriz extracelular fazendo com que as células não encontrem pontos de ancoragem e adesão (Da Silveira *et al.*, 2020; Majhy *et al.*, 2021).

Da mesma forma, a rugosidade presente no material, afeta a fixação e proliferação celular. A membrana celular tende a penetrar nos sulcos ou irregularidades para aumentar a área de contato, porém, quando essas rugosidades não são planejadas, acabam influenciando negativamente a adesão celular. Quando as rugosidades estão em muita quantidade, a área de contato entre em uma célula e outra é afetada, comprometendo a adesão, sinalização, espalhamento, migração e proliferação celular (Majhy *et al.*, 2021).

Jyotsana et al. apresentam uma opção para superar os desafios das propriedades físico-químicas, como, por exemplo, tratamento com plasma de oxigênio, seguido de recobrimento com colágeno ou fibronectina, que são amplamente utilizados para aumentar a hidrofobicidade e promover adesão celular (Jyotsana et al., 2020).

A tecnologia “Organ-on-Chip” tem sido tradicionalmente baseada em PDMS devido à sua transparência, facilidade de fabricação e compatibilidade com microfluídica. No entanto, para superar as limitações apresentadas, pesquisas recentes têm explorado polímeros híbridos e biomateriais que mimetizam a matriz extracelular, oferecendo uma alternativa promissora para aprimorar a funcionalidade dos chips.

Dado esse cenário, várias alternativas ao PDMS vêm sendo exploradas, uma delas é a utilização de hidrogéis como matriz ou como componente funcional em microcanais. Akther *et al.* mostram em seu trabalho que hidrogéis, pela sua alta taxa de hidratação e rede porosa, podem imitar de forma mais fiel a matriz extracelular de tecidos humanos, oferecendo suporte para cultura 3D, perfusão e microambientes controlados (Akther *et al.*, 2020).

O estudo também cita que os hidrogéis podem reduzir o impacto negativo de usar apenas plataformas rígidas ou inertes, oferecendo porosidade ajustável, elasticidade próxima à de tecidos moles e pontos de enlace para adesão celular. Porém, os hidrogéis possuem menor estabilidade mecânica, maior complexidade de integração microfluídica e possíveis desafios de selagem (Akther *et al.*, 2020).

Apesar do potencial, este estudo apresenta limitações importantes: o número reduzido de dispositivos funcionais, a ausência de testes com diferentes tratamentos de superfície e a falta

de replicação experimental. Como próximos passos, faz-se necessário a padronização do processo de fabricação, implementação de estratégias de funcionalização e avaliação de parâmetros como fluxo e gradientes químicos, visando maior fidelidade ao microambiente tumoral.

Em síntese, os resultados reforçam que a funcionalidade do chip depende não apenas do *design* estrutural, mas também da modificação físico-química do PDMS. Avanços recentes indicam que a integração dessas estratégias é viável e necessária para consolidar o uso de dispositivos microfluídricos em pesquisas oncológicas, oferecendo uma alternativa inovadora e promissora para estudos de metástase e desenvolvimento de terapias direcionadas.

6. Conclusão

Esse estudo demonstrou uma baixa adesão e viabilidade celular no chip microfluídico, porém não é possível estabelecer uma causa definitiva para o problema. A falta de replicação, o *design* estrutural ou as propriedades físico-químicas do PDMS, como alta hidrofobicidade e baixa energia superficial, que dificultam a formação de pontos de ancoragem. Além disso, a rugosidade não planejada comprometeu processos essenciais como adesão, migração e proliferação celular.

Esses resultados reforçam que, para tornar a tecnologia “Organ-on-Chip” aplicável em pesquisas oncológicas, é necessário a implementação de estratégias que melhorem a interação célula-superfície, ajuste no *design* do molde, modificação química, proporção do PDMS e escolha adequada de biomateriais. No entanto, essas abordagens apresentam desafios técnicos que exigem padronização e otimização.

Estudos futuros devem incluir replicações experimentais, testes comparativos com diferentes materiais e avaliação de parâmetros, garantindo maior consistência e reprodutibilidade dos resultados. A implementação dessas estratégias permitirá desenvolver dispositivos mais representativos do microambiente tumoral, ampliando sua aplicabilidade em estudos de metástase, na triagem de fármacos e no desenvolvimento de terapias direcionadas, consolidando o potencial translacional da tecnologia “Organ-on-Chip”.

Referências

- [1] Akther, F. *et al.* **Hydrogels as artificial matrices for cell seeding in microfluidic devices.** RSC Advances, v. 10, n. 71, p. 43682–43703, 2020.

- [2] Alexander S, Koehl GE, Hirschberg M, Geissler EK, Friedl P. **Dynamic imaging of cancer growth and invasion: a modified skin-fold chamber model.** *Histochem Cell Biol.* 2008;130(6):1147-1154. doi:10.1007/s00418-008-0529-1
- [3] Ashammakhi, Nureddin *et al.* **“Kidney-on-a-chip: untapped opportunities.”** *Kidney international* vol. 94,6 (2018): 1073-1086. doi:10.1016/j.kint.2018.06.034
- [4] Avula, L. R., & Grodzinski, P. (2024). **How organ-on-a-chip is advancing cancer research and oncology: A cancer hallmarks’ perspective.** *Frontiers in Lab on a Chip Technologies*, 3. <https://doi.org/10.3389/frlct.2024.1487377>
- [5] Axiak-Bechtel, S. M., Mathew, L. M., Amorim, J. R., & DeClue, A. E. (2019). **Dogs with osteosarcoma have altered pro- and anti-inflammatory cytokine profiles.** *Veterinary medicine and science*, 5(4), 485–493. <https://doi.org/10.1002/vms3.191>
- [6] Banday MZ, Sameer AS, Mir AH, Mokhdomi TA, Chowdri NA, Haq E. **Matrix metalloproteinase (MMP) -2, -7 and -9 promoter polymorphisms in colorectal cancer in ethnic Kashmiri population - A case-control study and a mini review.** *Gene.* 2016;589(1):81-89. doi:10.1016/j.gene.2016.05.028
- [7] Beck, J., Ren, L., Huang, S., Berger, E., Bardales, K., Mannheimer, J., Mazcko, C., & LeBlanc, A. (2022). **Canine and murine models of osteosarcoma.** *Veterinary pathology*, 59(3), 399–414. <https://doi.org/10.1177/03009858221083038>
- [8] Buttacavoli, M., Di Cara, G., Roz, E., Pucci-Minafra, I., Feo, S., & Cancemi, P. (2021). **Integrated Multi-Omics Investigations of Metalloproteinases in Colon Cancer: Focus on MMP2 and MMP9.** *International journal of molecular sciences*, 22(22), 12389. <https://doi.org/10.3390/ijms222212389>
- [9] Da Silveira, G. A. T. *et al.* **Surface modification of PDMS substrates for tumour cell adhesion: Influence of roughness parameters.** *MEDICAL DEVICES & SENSORS*, v. 4, n. 1, 6 dez. 2020.
- [10] Farhang Doost, N., & Srivastava, S. K. (2024). **A Comprehensive Review of Organ-on-a-Chip Technology and Its Applications.** *Biosensors*, 14(5), 225. <https://doi.org/10.3390/bios14050225>
- [11] Fenger, J. M., London, C. A., & Kisseberth, W. C. (2014). **Canine osteosarcoma: a naturally occurring disease to inform pediatric oncology.** *ILAR journal*, 55(1), 69–85. <https://doi.org/10.1093/ilar/ilu009>
- [12] Fowles, J. S., Dailey, D. D., Gustafson, D. L., Thamm, D. H., & Duval, D. L. (2017). **The Flint Animal Cancer Center (FACC) Canine Tumour Cell Line Panel: a resource for veterinary drug discovery, comparative oncology and translational medicine.** *Veterinary and comparative oncology*, 15(2), 481–492. <https://doi.org/10.1111/vco.12192>
- [13] Jyotsana Priyadarshani; Chakraborty, S.; Das, S. **Tailoring PDMS microfluidic channel surfaces for improved cell adhesion.** *AIP conference proceedings*, 1 jan. 2020.
- [14] Kim, S., Chung, M., & Jeon, N. L. (2016). **Three-dimensional biomimetic model to reconstitute sprouting lymphangiogenesis in vitro.** *Biomaterials*, 78, 115–128. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.11.019>
- [15] Liang, A., Tao, T., Chen, J., Yang, Y., Zhou, X., Zhu, X., & Yu, G. (2025). **Immunocompetent tumor-on-a-chip: A translational tool for drug screening and cancer therapy.** *Critical reviews in oncology/hematology*, 210, 104716. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2025.104716>
- [16] Luu, A. K., Wood, G. A., & Vilorio-Petit, A. M. (2021). **Recent Advances in the Discovery of Biomarkers for Canine Osteosarcoma.** *Frontiers in veterinary science*, 8, 734965. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.734965>

- [17] Li, Z., Wang, Y., Dong, S., Ge, C., Xiao, Y., Li, R., Ma, X., Xue, Y., Zhang, Q., Lv, J., Tan, Q., Zhu, Z., Song, X., & Tan, J. (2014). **Association of CXCR1 and 2 expressions with gastric cancer metastasis in ex vivo and tumor cell invasion in vitro.** *Cytokine*, 69(1), 6–13. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2014.05.004>.
- [18] Liu, X., Su, Q., Zhang, X., Yang, W., Ning, J., Jia, K., Xin, J., Li, H., Yu, L., Liao, Y., & Zhang, D. (2022). **Recent Advances of Organ-on-a-Chip in Cancer Modeling Research.** *Biosensors*, 12(11), 1045. <https://doi.org/10.3390/bios12111045>
- [19] Majghy, B.; Priyadarshini, P.; K. Sen, A. **Effect of surface energy and roughness on cell adhesion and growth – facile surface modification for enhanced cell culture.** *RSC Advances*, v. 11, n. 25, p. 15467–15476, 2021.
- [20] McCullagh, P. (1984). **Generalized linear models.** *European Journal of Operational Research*, 16(3), 285–292. [https://doi.org/10.1016/0377-2217\(84\)90282-0](https://doi.org/10.1016/0377-2217(84)90282-0)
- [21] Morello, E., Martano, M., & Buracco, P. (2011). **Biology, diagnosis and treatment of canine appendicular osteosarcoma: similarities and differences with human osteosarcoma.** *Veterinary journal (London, England : 1997)*, 189(3), 268–277. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2010.08.014>
- [22] Pezeshkian, Z., Nobili, S., Peyravian, N., Shojaee, B., Nazari, H., Soleimani, H., Asadzadeh-Aghdaei, H., Ashrafiyan Bonab, M., Nazemalhosseini-Mojarad, E., & Mini, E. (2021). **Insights into the Role of Matrix Metalloproteinases in Precancerous Conditions and in Colorectal Cancer.** *Cancers*, 13(24), 6226. <https://doi.org/10.3390/cancers13246226>
- [23] Regmi, S., Poudel, C., Adhikari, R., & Luo, K. Q. (2022). **Applications of Microfluidics and Organ-on-a-Chip in Cancer Research.** *Biosensors*, 12(7), 459. <https://doi.org/10.3390/bios12070459>
- [24] Romanucci, M., De Maria, R., Morello, E. M., & Della Salda, L. (2023). **Editorial: Canine osteosarcoma as a model in comparative oncology: Advances and perspective.** *Frontiers in veterinary science*, 10, 1141666. <https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1141666>
- [25] Sharma, S., Venzac, B., Burgers, T., Le Gac, S., & Schlatt, S. (2020). **Microfluidics in male reproduction: is ex vivo culture of primate testis tissue a future strategy for ART or toxicology research?.** *Molecular human reproduction*, 26(3), 179–192. <https://doi.org/10.1093/molehr/gaaa006>
- [26] Srivastava, S. K. *et al.* **“Organ-on-Chip” technology: Opportunities and challenges.** *Biotechnology Notes*, v. 5, p. 8–12, 1 jan. 2024.
- [27] Suhail, Y., Cain, M. P., Vanaja, K., Kurywchak, P. A., Levchenko, A., Kalluri, R., & Kshitiz (2019). **Systems Biology of Cancer Metastasis.** *Cell systems*, 9(2), 109–127. <https://doi.org/10.1016/j.cels.2019.07.003>
- [28] Tang, H., Xie, J., Du, YX. *et al.* (2024). **Osteosarcoma neutrophil extracellular trap network-associated gene recurrence and metastasis model.** *J Cancer Res Clin Oncol* 150, 48. <https://doi.org/10.1007/s00432-023-05577-2>
- [29] Teixeira, L. V., Martins, D. B., Figuera, R., & Lopes, S. T. dos A. (2018). **Estudo clínico de osteossarcoma canino.** *Acta Scientiae Veterinariae*, 38(2), 185–190. <https://doi.org/10.22456/1679-9216.16620>
- [30] Xu, H., Wen, J., Yang, J., Zhou, S., Li, Y., Xu, K., Li, W., & Li, S. (2024). **Tumor-microenvironment-on-a-chip: the construction and application.** *Cell communication and signaling : CCS*, 22(1), 515. <https://doi.org/10.1186/s12964-024-01884-4>
- [31] Yu, Y., Zhou, T., & Cao, L. (2023). **Use and application of organ-on-a-chip platforms in cancer research.** *Journal of cell communication and signaling*, 17(4), 1163–1179. <https://doi.org/10.1007/s12079-023-00790-7>

- [32] ZHANG, B. *et al.* **Advances in organ-on-a-chip engineering.** Nature Reviews Materials, v. 3, n. 8, p. 257–278, ago. 2018.