

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO MESQUITA FILHO"
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

GABRIELA RODRIGUES ROCHA

**BIOFABRICAÇÃO DE BONE-ON-A-CHIP PARA APLICAÇÃO EM ENSAIOS
IN VITRO VISANDO A AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE OSTEOCLASTOS**

BOTUCATU
2024

GABRIELA RODRIGUES ROCHA

**BIOFABRICAÇÃO DE BONE-ON-A-CHIP PARA APLICAÇÃO EM ENSAIOS
IN VITRO VISANDO A AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE OSTEOCLASTOS**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE
CURSO DE GRADUAÇÃO
APRESENTADO AO INSTITUTO DE
BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU,
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO MESQUITA FILHO”, PARA
OBTENÇÃO DO TÍTULO DE BACHAREL
EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS.

ORIENTADOR: PROFº. DR. WILLIAN
FERNANDO ZAMBUZZI

**BOTUCATU
2024**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: MARIA CAROLINA A. CRUZ E SANTOS-CRB 8/10188

Rocha, Gabriela Rodrigues.

Biofabricação de *Bone-on-a-chip* para aplicação em ensaios *in vitro* visando a avaliação da atividade de osteoclastos / Gabriela Rodrigues Rocha. - Botucatu, 2024

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Willian Fernando Zambuzzi

Capes: 20800002

1. Circuitos integrados. 2. Osteoclastos. 3. Remodelação óssea. 4. Tecidos Suporte. 5. Engenharia tecidual.

Palavras-chave: Funcionalidade; *Organ-on-a-chip*; Osteoclastos; Remodelação Óssea; *Scaffold*.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha mãe Valéria, que sempre apoiou meus estudos e se dedicou totalmente para que pudesse estudar fora e conquistar meus sonhos, que além de ser uma mãe também é minha melhor amiga e sempre esteve do meu lado nessa jornada.

A minha irmã Nathália agradeço por sempre estar do meu lado, sendo um apoio e uma grande amiga mesmo que de longe.

Agradeço ao meu pai por me ajudar a me sustentar em Botucatu e também apoiar meus sonhos e estudos.

Ao meu tio Valter, minha tia Rosely, minha avó Maria José e meu avô José Mendes por me ajudarem a me desenvolver como pessoa e também incentivarem o meu crescimento profissional nos estudos. Agradeço a minha falecida tia Margarida por ter me ajudado no começo da graduação com as despesas.

Ao meu falecido avô Walter, quem eu tive o privilégio de ser neta e aprender muito sobre as coisas mais lindas da vida, sobre a importância da curiosidade, do ensino e do questionamento na infância, quem sempre apoiou meus sonhos, foi um exemplo de pessoa e um grande amigo.

Agradeço a República Sansão, que foi mais que uma moradia durante os anos de graduação, foi um lar onde tive a oportunidade de fazer grandes amizades, me desenvolver no convívio com outras e aproveitar os anos graduação com pessoas incríveis e lindas memórias. Agradeço especialmente a Aline Amaro, Amanda Queiroz, Julia Chaves, Luana Oliveira e Nathália Campos por terem sido minhas grandes parceiras.

Agradeço as minhas colegas de sala Beatriz Barcelos, Beatriz Bressani, Marcela Gonçalves e Marina Whittle pela amizade e companheirismo durante os anos de graduação. Agradeço também a Caio Fernando Ferreira Mussatto pelo apoio e parceria.

Ao Laboratório de Bioensaios e Dinâmica Celular, agradeço por ter me acolhido e me auxiliado no Estágio Obrigatório, Iniciação Científica e finalização da graduação com grandes oportunidades. Agradeço especialmente ao meu Orientador Prof Willian

Fernando Zambuzzi por ter possibilitado a minha conquista da bolsa Fapesp, e ao meu colega de laboratório, Guilherme Sousa por ter me auxiliado, explicado e me orientado durante minha IC e também por ter sugerido o tema dela.

Agradeço ao sistema público de educação brasileiro e à Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” por ter proporcionado minha formação e ensino gratuito e de qualidade.

Enfim, agradeço a todos que me auxiliaram de alguma forma durante a minha formação.

"Em algum lugar, algo incrível está
esperando para ser descoberto."

-Carl Sagan

RESUMO

A tecnologia *Organ-on-a-chip* (OoC) consiste em dispositivos microfluídicos para cultura de células que se assemelham a tecidos ou órgãos em um nível fisiológico. Essa tecnologia tem apresentado um panorama promissor em diversas áreas, especialmente na engenharia de tecidos, com ênfase particular em pesquisas de bioengenharia e engenharia biomédica. Em comparação com modelos animais e modelos de cultura de células 2D, o OoC permite a cultura de células e tecidos de modo eficiente e fisiologicamente relevante, criando microambientes sob medida e com integração de sensores e fontes de estímulos. O modelo "*Bone-on-a-chip*" proposto, que reproduz um microambiente com características-chave do tecido ósseo *in vivo*, tem como objetivo produzir o *Organ-on-a-chip* para o tecido ósseo e investigar a sua funcionalidade. Os chips foram fabricados através de tecnologia de impressão 3D e são compostos por um modelo retangular com espaço para três poços e seis poços destinados a três e seis fatias de osso. A inclusão de *scaffolds* biológicos no chip, feitos de discos ósseos bovinos, reproduz um microambiente deste tecido para atividade metabólica e celular, permitindo a observação de buracos biomiméticos gerados após a reabsorção óssea da matriz. Após a fabricação, foram realizados testes para verificar a eficiência da introdução de fluídos dentro do sistema. Por fim, o intuito deste trabalho é produzir um *Bone-on-a-chip* funcional para futuras análises celulares do papel dos osteoclastos na remodelação óssea.

Palavras-chave: *Organ-on-a-chip*, *Scaffold*, Funcionalidade, Osteoclastos, Remodelação Óssea

ABSTRACT

Organ-on-a-chip (OoC) technology consists of microfluidic devices for cell culture that mimic tissues or organs at a physiological level. This technology has shown promising prospects in various areas, especially in tissue engineering, with a particular emphasis on bioengineering and biomedical engineering research. Compared to animal models and 2D cell culture models, OoC allows for efficient and physiologically relevant cell and tissue culture, creating tailored microenvironments with integrated sensors and stimulus sources. The proposed "Bone-on-a-chip" model, which replicates a microenvironment with key characteristics of in vivo bone tissue, aims to produce an Organ-on-a-chip for bone tissue and investigate its functionality. The chips were manufactured using 3D printing technology and consist of a rectangular model with space for three wells and six wells intended for three and six bone slices. The inclusion of biological scaffolds in the chip, made from bovine bone discs, replicates a microenvironment of this tissue for metabolic and cellular activity, allowing the observation of biomimetic holes generated after bone matrix resorption. After manufacturing, tests were conducted to verify the efficiency of fluid introduction into the system. Ultimately, the aim of this work is to produce a functional Bone-on-a-chip for future cellular analyses of the role of osteoclasts in bone remodeling.

Keywords: Organ-on-a-chip, Scaffold, Functionality, Osteoclasts, Bone Remodeling

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Ilustração da tecnologia Organ-on-a-chip para mimetizar a função e estrutura de órgãos humanos	12
Figura 2- Representação gráfica do desenvolvimento de órgão em um chip para modelagem de doenças e desenvolvimento de terapia para modelagem de precisão	12
Figura 3: Estímulos bioquímicos e biofísicos aplicados a modelos organ-on-a-chip	13
Figura 4- Diagrama esquemático que compara a relevância fisiológica de cada tipo de modelo utilizado na pesquisa biomédica.....	14
Figura 5- Representação gráfica de cultura celular em 2D, cultura celular em 3D e o modelo Organ-on-a-chip.....	15
Figura 6- Desenho de modelo de Chip estático com 6 poços.....	19
Figura 7- Desenho de modelo de Chip estático com 3 poços.....	20
Figura 8- Representação gráfica da impressão 3D do tipo DLP. O projetor (5) emite luz ultravioleta (7) diretamente ao espelho (6) que a reflete na resina (3) alocada no tanque de resina (8). Logo, a peça desejada (1) é impressa camada a camada. Dependendo do formato, suportes (2) também curados são adicionados à impressão para amparar a formação da estrutura. Quando pronta, a impressão anexada à mesa de impressão (4) já pode ser retirada para uso.	21
Figura 9- (A) Impressora Elegoo Mars 2 Pro (B) Máquina de lavagem e cura Elegoo Mercury Plus	22
Figura 10- Moldes de resina para produção de OoC (A) e (B): Molde de 3 poços de 12,2mm de diâmetro (C) e (D): Moldes de 6 poços de 4,2mm de diâmetro	22
Figura 11- Técnicas e aplicação de microfabricação (a) Uso de moldagem de réplica para produção do “carimbo” de PDMS.....	23
Figura 12- Molde de resina com mistura de PDMS e curador com bolhas (A) Molde de 3 poços (B) Molde de 6 poços	24
Figura 13- Moldes de resina com a solução de PDMS e agente de cura com bolhas (B) Pressurizador com moldes dentro a -550 mmHg	24
Figura 14- Moldes com PDMS na estufa.....	25
Figura 15- Retirada do elastômero PDMS de dentro do molde de resina com uso de uma lâmina de gilete e álcool isopropílico. (A) Retirada do polímero de 6 poços (B) Retirada do polímero de 3 poços	25
Figura 16- PDMS endurecido retirado do molde	26
Figura 17- Perfuração do polímero com três poços com caneta perfuradora	26
Figura 18- Polímero recebendo nitrogênio gasoso	27
Figura 19- Lâmina e polímero de PDMS no forno de fusão de ozônio	27
Figura 20- Ilustração das etapas do processo de (a) ativação de superfície com plasma de oxigênio ou tratamento corona.....	28
Figura 21- Gel molde do chip com três <i>bone slices</i> inseridos nos três poços.....	28
Figura 22- Gel molde do chip com seis <i>bone slices</i> inseridos nos seis poços	29
Figura 23- <i>Bone-on-a-chip</i> com três poços pronto	29
Figura 24- <i>Bone-on-a-chip</i> com seis poços pronto	29
Figura 25- Etapas de criação dos scaffolds. A: Ossos bovinos após remoção da carne residual. B: Congelamento dos dois grupos. C: Descongelamento dos ossos. D: Tratamento químico com SDS no grupo híbrido. E: Perfuração óssea com furadeira. F: Osso compacto	

de fêmur bovino perfurado. G: Fragmento ósseo trabecular com córtex compacto. H: Divisão no meio de cada fragmento ósseo. I: Fragmento ósseo compacto dividido ao meio.	31
Figura 26- Fragmentos ósseos de 4mm de diâmetro oriundos da perfuração da broca antes de serem repartidos ao meio	32
Figura 27- Disco ósseo de 14mm de diâmetro após ser lixado	32
Figura 28- Disco ósseo de 14mm de diâmetro após ser lixado	32
Figura 29- Inserção de PBS no Bone-on-a-chip para teste de eficiência.....	33
Figura 30- Teste de evaporação com diferentes técnicas de cultura (A) Gotas em cima dos poços (B) BoC imerso em solução tampão (C) Reservatórios feitos para gotejamento nos chips	35
Figura 31- Modelos de Bone-on-a-chip estático (A),(C),(E): Bone-on-a-chip de 3 poços (B), (D), (F): Bone-on-a-chip de 6 poços.....	35
Figura 32- <i>Bone slices</i> prontos (A) Discos de 12mm de diâmetro (B) Discos de 4mm de diâmetro.....	36
Figura 33-Explicação da estrutura óssea. Dois tipos principais de osso incluem osso esponjoso (trabecular ou esponjoso) e osso compacto (cortical). (a) O osso esponjoso é altamente poroso. (b) O osso compacto consiste em ósteon ou sistema haversiano, circundado pela lamela que é composta por nervos e vasos sanguíneos.	37
Figura 34- Microscopia eletrônica do osso esponjoso/trabecular (A) e (B) e do osso compacto/cortical (C) e (D).	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Definição dos 3Rs	14
Tabela 2- Comparação das características entre a cultura celular bidimensional e tridimensional	15
Tabela 3- Delineamento experimental dos chips	19

SUMÁRIO

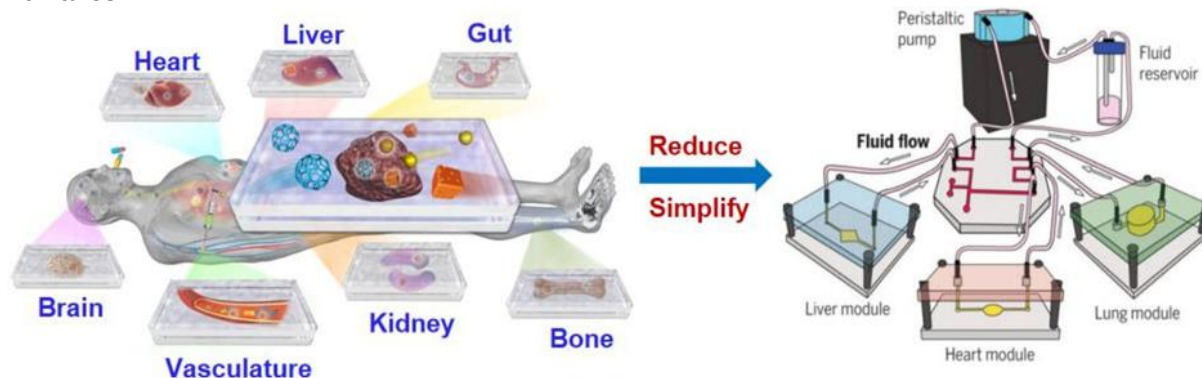
1. INTRODUÇÃO.....	11
2. OBJETIVOS	18
3. METODOLOGIA E ANÁLISE DE RESULTADOS	18
3.1. Design do chip.....	18
3.2. Manufatura do molde do chip em resina por impressão 3D do tipo “DLP” (<i>Direct Liquid Printing</i>)	20
3.3. Manufatura do chip em PDMS.....	23
3.4. Produção de <i>boneslices</i> a partir de <i>scaffolds</i> biológicos.....	30
3.5. Testes de introdução de fluídos no chip	33
3.6. Ensaio de evaporação de líquidos no BoC	33
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	35
4.1. Manufatura do chip em PDMS.....	35
4.2. Produção de <i>bone slices</i> a partir de <i>scaffolds</i> biológicos.....	36
4.3. Ensaio de evaporação de líquidos no BoC	38
5. CONCLUSÕES.....	38
6. PERSPECTIVAS FUTURAS	39
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:.....	40

1. INTRODUÇÃO

A tecnologia *Organ-on-a-chip* (Ooc: “órgão-em-um-chip”) trata-se de um recurso de pesquisa biomédica e farmacológica constituída por dispositivos de microfluídica para cultura celular semelhante a tecidos e/ou órgãos a nível fisiológico (KO et al., 2022). Este modelo vem se mostrando promissor nas últimas décadas para o cenário da medicina na área de engenharia de tecidos, biossensores, diagnóstico e terapia e entrega de drogas, mas ganhou destaque especial na bioengenharia e pesquisa em engenharia biomédica (AZIZIPOUR et al., 2020). As limitações técnicas das tecnologias atuais de desenvolvimento de medicamentos e culturas celulares manifestam a necessidade da criação de um modelo que supere as dificuldades de reproduzir os mecanismos fisiológicos humanos *in vitro* (MASCHMEYER; KAKAVA, 2022). Embora seja uma tecnologia nova, ainda pouco estabelecida em laboratórios de pesquisa ao redor do mundo e no Brasil, profissionais de diversas áreas estão investindo esforços, em nível global, para o desenvolvimento e aplicação desta tecnologia. (KO et al., 2022).

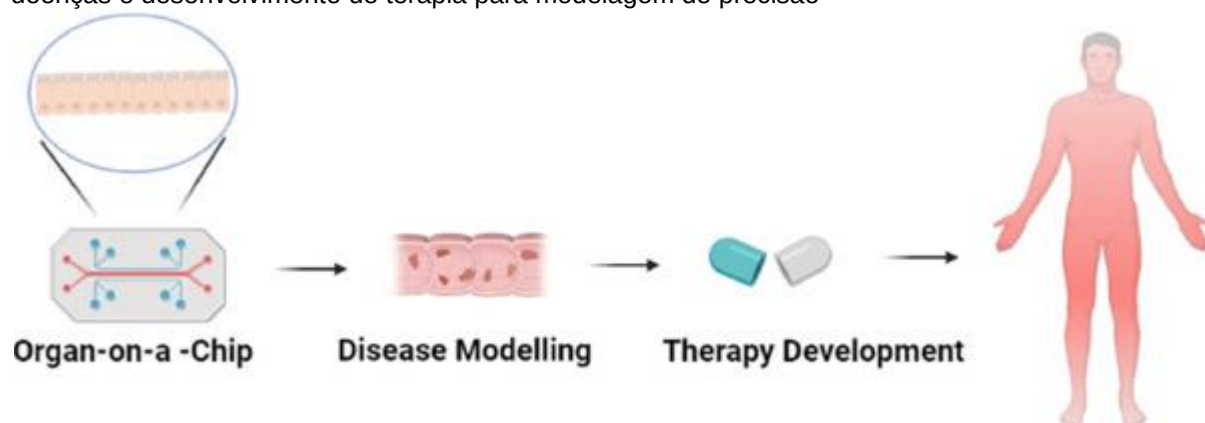
O *Organ-on-a-chip* é composto por redes de microcanais projetadas para orientar e manipular volumes de soluções que variam de picolitros a mililitros, assim como culturas celulares características desse domínio (HARRISON et al., 1992; MANZ; GRABER; WIDMER, 1990; WHITESIDES, 2006). Esse microambiente condicionado, embora seja uma representação miniaturizada dos órgãos, demonstra eficácia na mimetização da fisiologia humana e suas doenças (LEUNG et al., 2022), como ilustra a Figura 1 e a Figura 2. A tecnologia revela-se promissora, uma vez que o desenvolvimento de medicamentos atualmente enfrenta desafios consideráveis em termos de custo, velocidade e desgaste, demandando assim novos paradigmas e ferramentas eficazes (LOW et al., 2021).

Figura 1- Ilustração da tecnologia Organ-on-a-chip para mimetizar a função e estrutura de órgãos humanos



Fonte: (PARK; GEORGESCU; HUH, 2019)

Figura 2- Representação gráfica do desenvolvimento de órgão em um chip para modelagem de doenças e desenvolvimento de terapia para modelagem de precisão

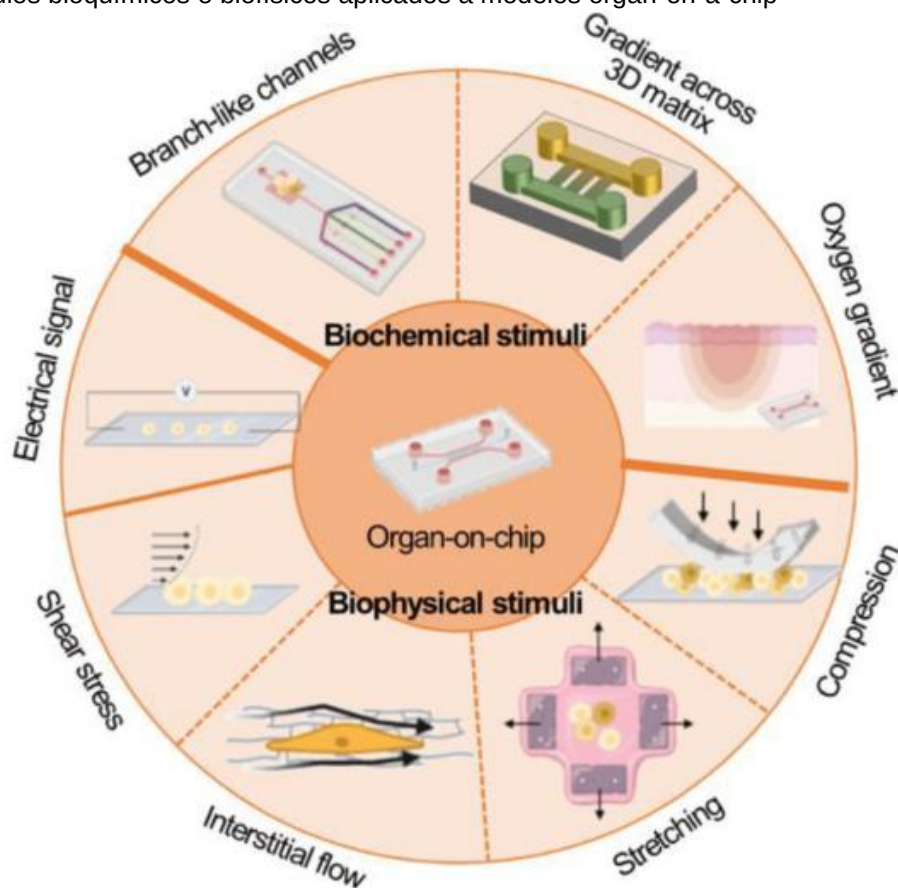


Fonte: (SINGH et al., 2022)

O modelo animal, apesar de ter contribuído significativamente para o estudo da fisiologia, de doenças e do desenvolvimento de medicamentos, ainda apresenta questionamentos quanto à extrapolação de dados para o organismo humano, fazendo necessária a criação de um modelo mais preditivo (HAY et al., 2014; SEOK et al., 2013). Atualmente mais de 80% dos medicamentos experimentais falham nos testes clínicos, sendo 60% destas falhas devido à falta de eficácia e outros 30% devido à toxicidade. No desenvolvimento de possíveis medicamentos, os candidatos a fármacos podem ser eliminados por falta de eficácia em animais ou pela descoberta de perigos ou toxicidade nas cobaias que podem não ser relevantes para os seres humanos (WARING et al., 2015). Ou seja, a resposta que obtemos com o teste em animais é incerta e nem sempre é relevante para o organismo humano.

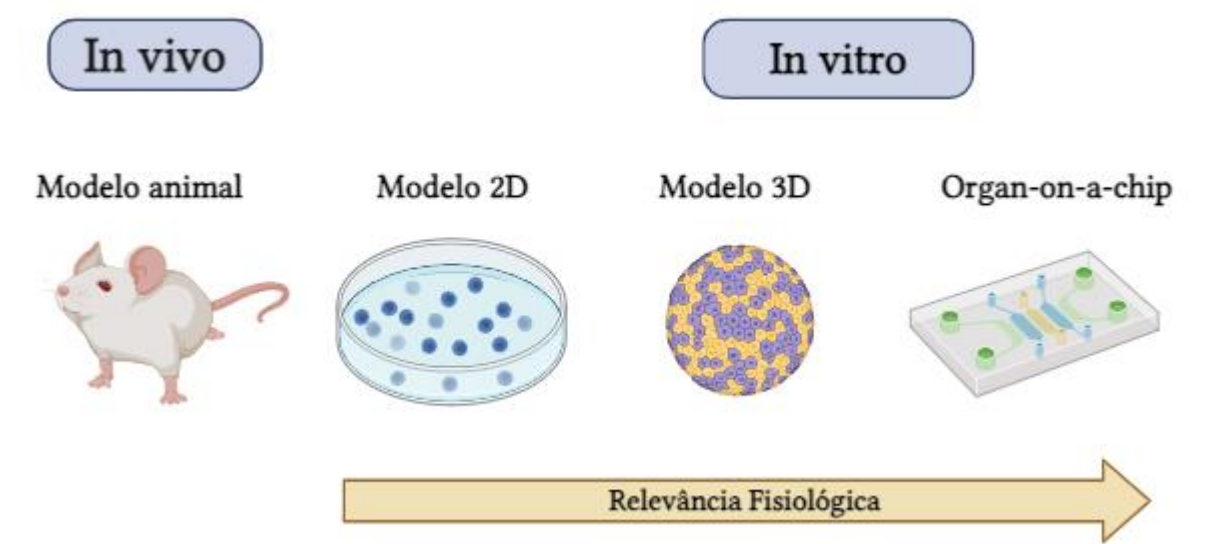
O exemplar OoC apresenta características interessantes em relação a eficiência do estudo e alcance de resultados que preenchem lacunas dos modelos *in vivo* e *in vitro*. O modelo OoC em sua conformação 3D possui a capacidade de acomodar células ou tecidos que, juntamente com os microfluídos, promovem um ambiente fisiologicamente significativo. Dentre os benefícios pode-se citar que os chips microfluídicos são projetados sob medida para cada sistema, há um controle preciso do seu microambiente, e também podem ser integrados com fontes de estímulos e sensores, por exemplo como ilustra a Figura 3. O modelo animal, em contrapartida, apresenta desafios na observação de fenômenos que ocorrem no tecido profundo dos modelos (KO et al., 2022). Fato que tem causado a retirada de medicamentos da fase clínica devido aos seus efeitos adversos (CONG et al., 2020). Ainda, o uso de modelos animais levanta questionamentos éticos de organizações como a *People for the Ethical Treatment of Animal* (PETA) (DANKU et al., 2022) e se faz relevante a sua substituição (Figura 4).

Figura 3: Estímulos bioquímicos e biofísicos aplicados a modelos organ-on-a-chip



Fonte: (KO et al., 2022)

Figura 4- Diagrama esquemático que compara a relevância fisiológica de cada tipo de modelo utilizado na pesquisa biomédica.



Fonte: Autoria própria, 2024

Tal como Russell e Burch (1959) descreveram a importância dos “3Rs” (substituição, redução e refinamento), a substituição ganha grande destaque neste projeto com a iniciativa de criar uma nova tecnologia que substitua os métodos de ensaios clínicos atuais.

Tabela 1- Definição dos 3Rs

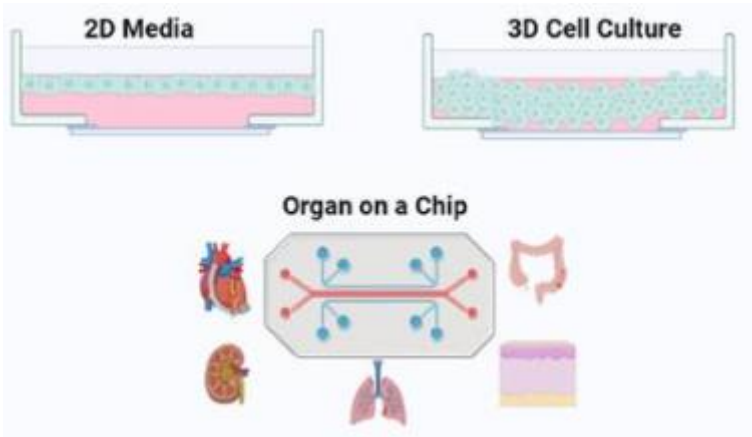
	Definição padrão	Definição contemporânea
<u>Substituição</u>	Métodos não animais	Acelerar o desenvolvimento e a utilização de ferramentas relevantes para o ser humano, baseadas nas tecnologias mais recentes
Redução	Número mínimo de animais consistente com os objetivos científicos	Experimentos com animais adequadamente projetados e considerados que sejam robustos e reprodutíveis
Refinamento	Dor, sofrimento, angústia ou dano duradouro mínimos	Novas tecnologias in vivo que podem beneficiar o bem-estar animal e a ciência

Fonte: (RUSSELL; BURCH, 1959)

Neste contexto, o modelo 2D de culturas de células tem sido o padrão utilizado para o entendimento da fisiologia humana, estudo de doenças, desenvolvimento de medicamentos e sua atuação, estudo da interação célula-célula e uso de imagens de

tecidos desde 1900 (FERREIRA; GASPAR; MANO, 2018). Porém, não permite a criação de uma relação entre célula-matriz e célula-célula o que causa perda na função celular, não podendo replicar o ambiente de uma forma fisiologicamente fiel (CONG et al., 2020) o que não é um problema no modelo *Organ-on-a-chip* em que as células crescem em 3 dimensões e as junções célula-célula imitam junções reais e podem ser observadas (SINGH et al., 2022) (Figura 5). Contudo, vale lembrar que apesar dos grandes e relevantes proveitos desta tecnologia, existem algumas desvantagens como fluxo de processamento não padronizado e indisponibilidade comercial atual (KO et al., 2022), assim como a Tabela 2 mostra com detalhes as vantagens e desvantagens de cada tipo de cultura celular.

Figura 5- Representação gráfica de cultura celular em 2D, cultura celular em 3D e o modelo Organ-on-a-chip



Fonte: (SINGH et al., 2022)

Tabela 2- Comparação das características entre a cultura celular bidimensional e tridimensional

Recursos/Características	Cultura de células 2D	Cultura de células 3D
Morfologia Celular	Achatado/Alongado Somente expansão 2D é permitida	O fenótipo da célula nativa é preservado As células crescem em 3 dimensões
Exposição ao meio celular	As células recebem exposição igual ao meio As células são mantidas na mesma fase de crescimento Os gases difundem-se para dentro e para fora das células de forma mais uniforme	Células no centro de massa 3 estão menos expostas ao meio Devido à exposição diferencial do meio, as células estão em diferentes fases de crescimento A difusão dos gases é desigual nas camadas internas versus a camada externa das células

Diferenciação celular	Células em 2D não se diferenciam bem	Células em cultura 3D se diferenciam bem
Junções celulares	Nenhuma imitação real de junções célula-célula é formada em culturas de células 2D	As junções célula-célula são observadas e imitam junções celulares reais
Sensibilidade a medicamentos	As células são muitas vezes irrealisticamente suscetíveis a drogas	As células são frequentemente resistentes a medicamentos em comparação com 2D e os resultados são comparáveis aos modelos <i>in vivo</i>
Proliferação celular	Muito rápido, não natural	Realista, imita condições naturais
Imagem e análise	Os procedimentos existentes são padronizados para células 2D A análise de imagens é padrão e mais fácil para células 2D	Os procedimentos não são padronizados para células 3D A obtenção de imagens e a análise são difíceis para células 3D
Expressão genética	A expressão genética não imita os modelos <i>in vivo</i>	A expressão gênica representa com mais precisão que os modelos <i>in vivo</i>
Custo	Baixo	Alto/caro

Fonte: (SINGH et al., 2022)

Versando sobre o órgão em questão, sabe-se que o tecido ósseo é um tecido com grande potencial de pesquisa e terapia, pois houve um rápido aumento de patologias músculo-esqueléticas, como fraturas e escoliose devido ao aumento da expectativa de vida e, conseqüente, envelhecimento da população mundial, (ROSETI et al., 2017). Assim, o tecido ósseo doente ou danificado, despertou uma enorme procura de substitutos ósseos para transplante, sendo o segundo tecido mais transplantado anualmente (TURNBULL et al., 2020). Atualmente, o tratamento padronizado para doenças ósseas trata-se de enxertos ósseos, como os autoenxertos e aloenxertos. Apesar de autoenxertos serem considerados como padrão ouro para regeneração óssea, tal método apresenta muitas desvantagens e limitações como riscos de infecção, dor e não é apropriado para reconstrução de grandes defeitos. Os aloenxertos possuem as mesmas questões além do risco de rejeição imunológica (JAZAYERI et al., 2017; LI et al., 2017; LU et al., 2019). Portanto, é necessário explorar novas abordagens como a engenharia de tecidos que oferece tratamentos alternativos para defeitos ósseos (ZHANG et al., 2018) como os *scaffolds* (arcabouços) biológicos

que reproduz mimeticamente um ambiente nativo e é de grande interesse na engenharia de tecido ósseo (AMIRAZAD; DADASHPOUR; ZARGHAMI, 2022).

O modelo “*Bone-on-a-chip*” (osso em um chip) realizado nesta pesquisa permite a reprodução de um microambiente com características-chave de um tecido vivo ósseo, e também fornecem condições de cultura de tecidos biomiméticos com maior poder preditivo em ensaios clínicos, permitindo avanços tecnológicos no campo da engenharia de tecidos. (MANSOORIFAR et al., 2021). Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi produzir um Bone-on-a-chip (BoC) funcional, desde a criação de seu design até a implementação do tecido ósseo e investigação da aplicabilidade destes modelos na diferenciação de células como os pré-osteoclastos. Estas células são essenciais na homeostase, durante o processo de remodelação óssea desde a dinâmica química e bioquímica da maturação até a diferenciação em osteoclastos (VI et al., 2015).

Com o intuito de reproduzir um microambiente ósseo para uma futura avaliação do metabolismo e atividade celular de osteoclastos, foram incluídos discos ósseos (*bone slices*) no chip. Os osteoclastos são responsáveis pela remoção do osso danificado através de ácidos e enzimas proteolíticas (por exemplo, cathepsina K) e ácido, que hidrolisa e solubiliza os componentes orgânicos e inorgânicos do osso, respectivamente (CHARLES; ALIPRANTIS, 2014; TEITELBAUM, 2000), logo, espera-se ser observado os “*pits*”, ou buracos artificiais que são gerados após a reabsorção matricial óssea (CHARLES; ALIPRANTIS, 2014).

O modelo *Bone-on-a-chip* foi feito através do método de fabricação em impressão 3D utilizando o modelo *Direct Liquid Printing* (DLP), técnica de gravura em uma matriz em resina, sobre o polidimetilsiloxano (PDMS). Esse material oferece ótimas características para a composição de um OoC como biocompatibilidade, permeabilidade a gás, transparência óptica e padronização de alta definição, além de permitir que os OoC utilize estímulos físicos e mecânicos para estimular as funções do órgão de estudo. (FERRAZ et al., 2018; GUMUSCU et al., 2015). A impressão 3D oferece vantagem em relação a geometria do microcanal que pode controlar a distribuição espacial através da deposição de camada em camada da resina de impressão (LEE et al., 2022).

Com uma plataforma eficiente e bem estabelecida, esta tecnologia pode ser utilizada para auxiliar o entendimento do processo de respostas ósseas a lesões ou

ao desenvolvimento de doenças (MA et al., 2021; VESPRESSY; YANG, 2016) o que é de grande contribuição às pesquisas do grupo pertencente ao laboratório de bioensaios e dinâmica molecular (LaBio), bem como demais centros que pesquisam sobre a remodelação óssea. O uso da tecnologia OoC irá potencializar o estudo de (pato)fisiologia ósseas através de um método inovador e promissor que permitirá o estudo multicelular, removendo as limitações temporais e espaciais que os modelos *in vivo* e *in vitro* de uma única célula impõem. Podemos citar como exemplo, os diferentes tempos de vida dos osteoclastos e osteoblastos (diferem em anos), além da divergência espacial que ambos os tipos celulares ocupam: não são observados no mesmo local durante o processo de remodelação óssea (GEORGE et al., 2018).

2. OBJETIVOS

Esse projeto de pesquisa tem como objetivo principal desenvolver um *Organ-on-a-chip* funcional de tecido ósseo para estudos de investigação da remodelação óssea. A produção do dispositivo é feita a partir de impressão 3D (tipo DLP), produção de *boneslices* originado de material biológico e junção destes dois elementos resultando em um *Bone-on-a-chip*. Por fim, espera-se que esta tecnologia seja funcional e aplicada para ensaios biológicos com cultura celular de osteoclastos. Para alcançar o objetivo principal, os seguintes objetivos foram desenvolvidos:

- 2.1. Design do chip feito com software de desenho assistido por computador para desenhos mecânicos
- 2.2. Manufatura do molde do chip em resina por impressão 3D do tipo “DLP” (*direct liquid printing*)
- 2.3. Manufatura do Chip em PDMS
- 2.4. Produção de *boneslices* a partir de scaffolds biológicos
- 2.5. Produção de um *Bone-on-a-chip* funcional
- 2.6. Testes de introdução de fluídos no chip
- 2.7. Ensaio de evaporação de líquidos no Ooc

3. METODOLOGIA E ANÁLISE DE RESULTADOS

3.1. Design do chip

O desenho do chip foi feito primeiramente em rascunho em papel e posteriormente, foi utilizado o software “Fusion 360”, aplicativo comercial de software CAD (“*Computer Aided Design*” ou desenho assistido por computador) para desenhar a peça desejada. A partir disso, foram criados dois modelos de chips estáticos, ou

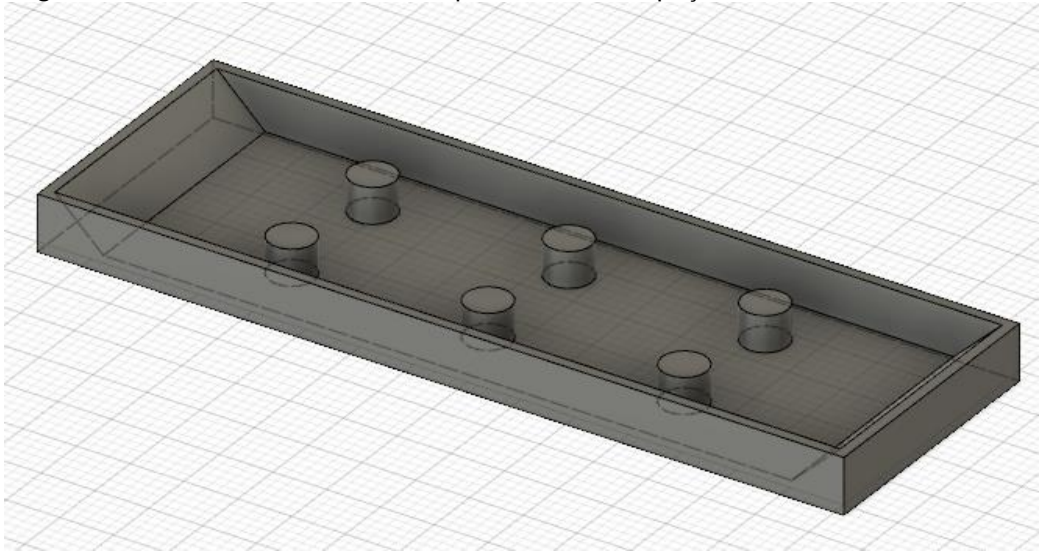
seja, cada poço não possui ligação com os demais de maneira que a ação celular é observada individualmente em cada disco ósseo. Foram desenhados um chip com 6 poços de 4,2 mm de diâmetro e 3,5mm de altura e um chip com 3 poços de 12,2mm de diâmetro e 4,5mm de altura.

Tabela 3- Delineamento experimental dos chips

Modelos dos Chips	
Poços de 4,2 mm de diâmetro	Chip com 6 poços independentes (Figura 6)
Poços de 12,2mm de diâmetro	Chip com 3 poços independentes (Figura 7)

Fonte: Autoria própria

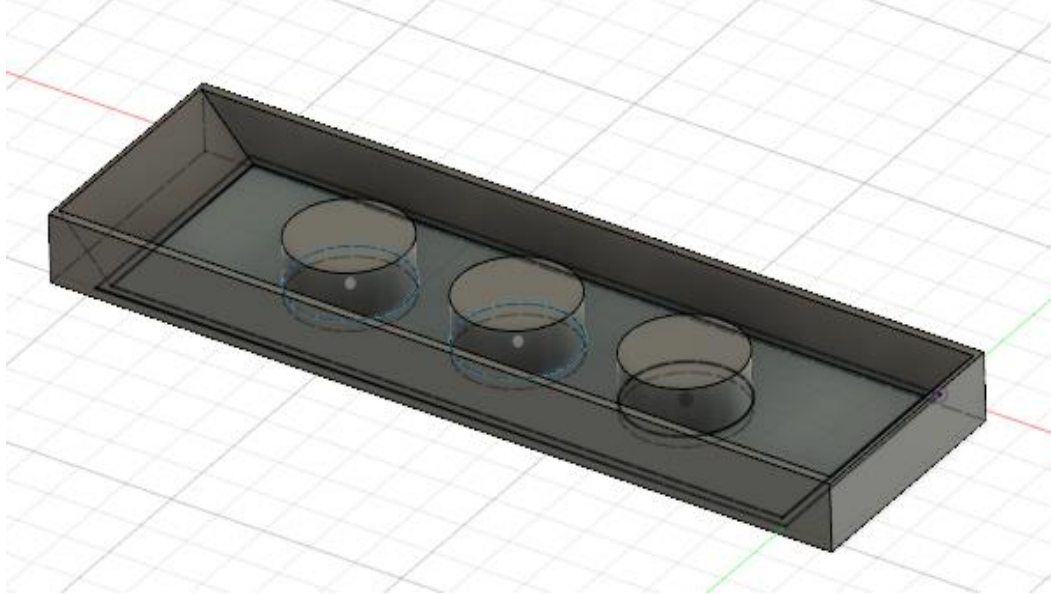
Figura 6- Desenho de modelo de Chip estático com 6 poços



Fonte: Autoria própria, 2023

Os chips com poços de 4,2 mm foram pensados para ter 2mm de raio com 1 μ m de tolerância para o encaixe dos discos de cada lado, ficando no total, 4,2mm de diâmetro. A altura designada foi de 3,5mm: 2mm para os discos, com tolerância de 1,5mm.

Figura 7- Desenho de modelo de Chip estático com 3 poços



Fonte: Autoria própria, 2023

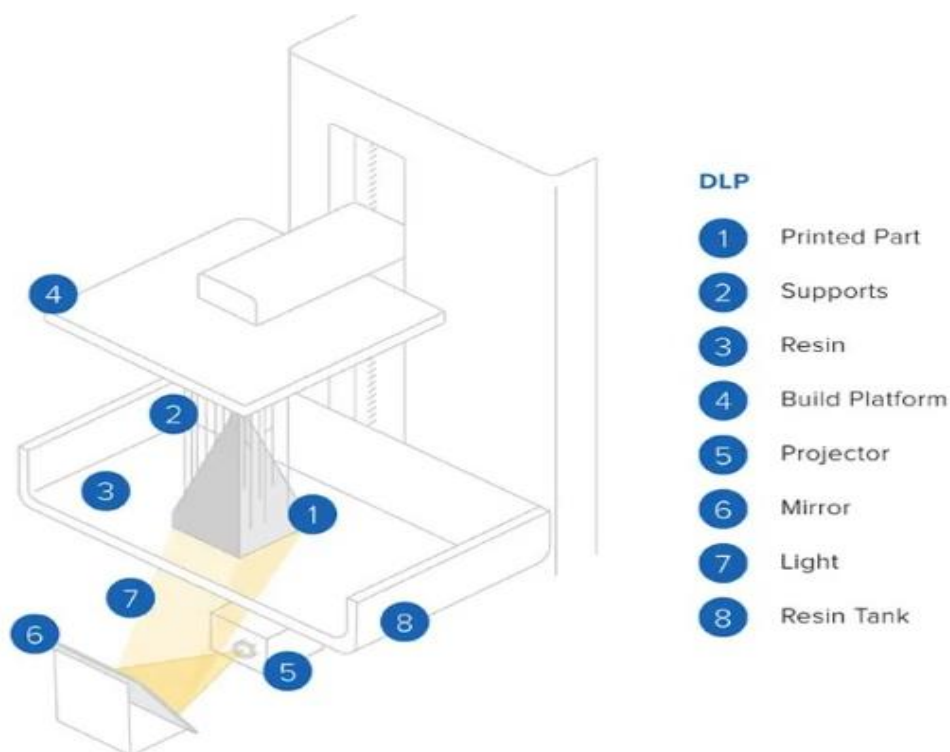
Os chips de 12,2mm foram pensados para ter 6mm de raio com 1 μ m de tolerância para cada lado, ou seja, com diâmetro total de 12,2mm. A altura designada foi de 4,5mm: 3mm para os discos com 1,5mm de tolerância.

3.2. Manufatura do molde do chip em resina por impressão 3D do tipo “DLP” (*Direct Liquid Printing*)

A partir da criação do modelo do chip, baseado no design computacional, este modelo foi exportado em um arquivo de extensão .STL, que é um tipo de arquivo que contém informações geométricas oriundas dos programas CAD, formato que os *softwares* fatiadores que geram os arquivos das impressoras 3D podem trabalhar. Tendo isso em mente, o arquivo .STL será fatiado no *software* livre “Chitubox”, que gera um arquivo de extensão .CTB, o qual foi utilizado pela impressora 3D para a impressão da peça que será o molde do chip. A impressora 3D utilizada é o modelo Elegoo Mars 2 Pro, da fabricante Elegoo, que utiliza resinas fotocuráveis. A resina que será utilizada 3DCure basic, 3DCure Belo Horizonte, Minas Gerais.

A escolha da impressora Elegoo Mars 2 Pro foi devido a acessibilidade dela em termos de custo (cerca de R\$1000,00) e facilidade de criar peças de modelo e design desejado. Além do mais, esta impressora é do tipo DLP (*“Direct Light Processing”* ou processamento de luz direta) em que há uma fonte de luz UV que se projeta diretamente na resina fotocurável (Figura 8). Quando atingida pela luz, a resina é curada, ou seja, endurecida em todos os pontos de cada camada simultaneamente, como ilustra a Figura 8.

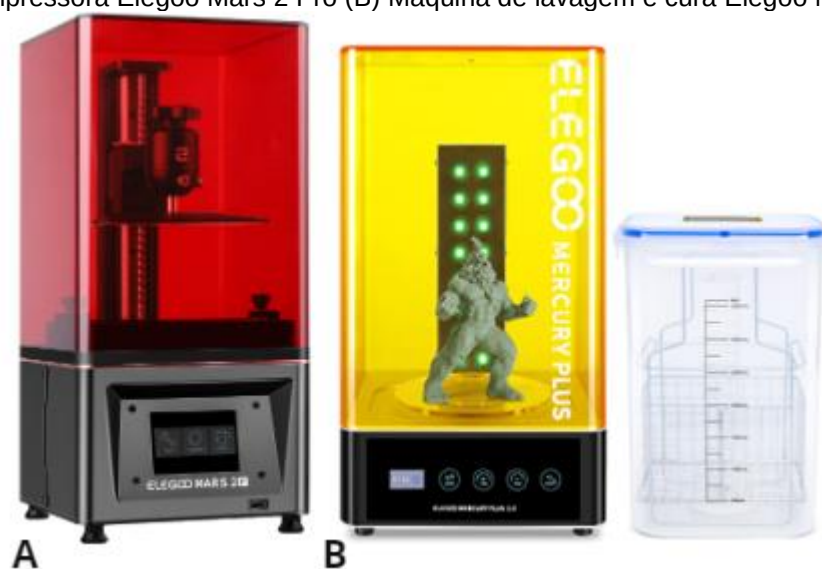
Figura 8- Representação gráfica da impressão 3D do tipo DLP. O projetor (5) emite luz ultravioleta (7) diretamente ao espelho (6) que a reflete na resina (3) alocada no tanque de resina (8). Logo, a peça desejada (1) é impressa camada a camada. Dependendo do formato, suportes (2) também curados são adicionados à impressão para amparar a formação da estrutura. Quando pronta, a impressão anexada à mesa de impressão (4) já pode ser retirada para uso.



Fonte: Fesmo

Após impresso, o molde é lavado em álcool 100% durante 20 min para remoção dos resíduos do material e a peça é curada novamente com luz ultravioleta para maior endurecimento durante o mesmo tempo de lavagem.

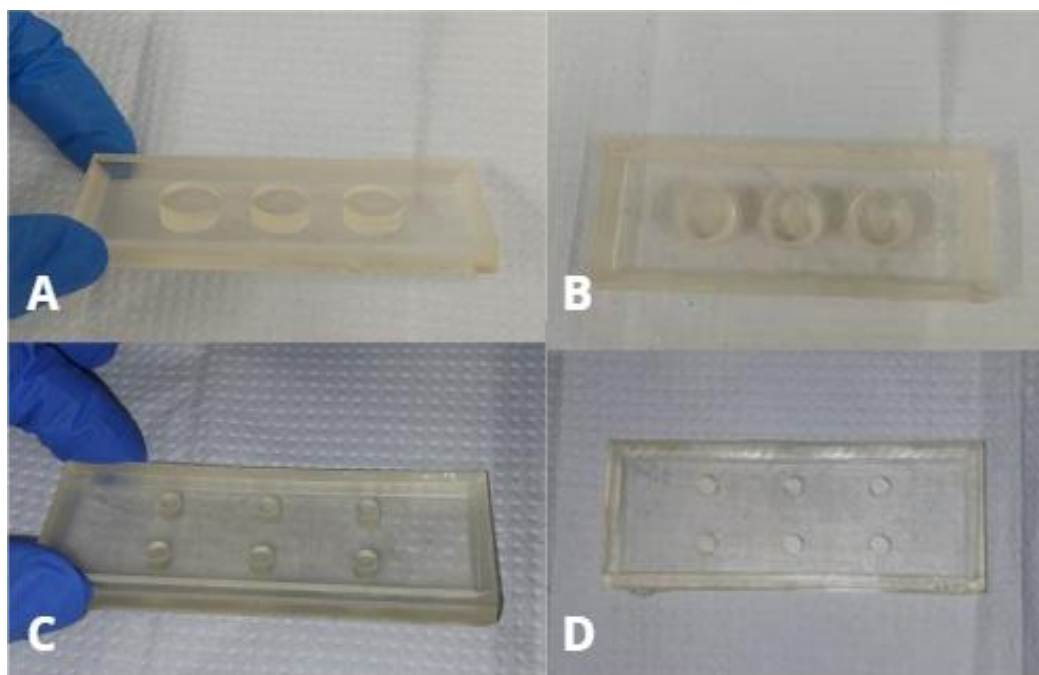
Figura 9- (A) Impressora Elegoo Mars 2 Pro (B) Máquina de lavagem e cura Elegoo Mercury Plus



Fonte: Autoria própria, 2024

Após os moldes serem tratados pela Elegoo Mercury Plus 2, eles já podem ser utilizados.

Figura 10- Moldes de resina para produção de OoC (A) e (B): Molde de 3 poços de 12,2mm de diâmetro (C) e (D): Moldes de 6 poços de 4,2mm de diâmetro



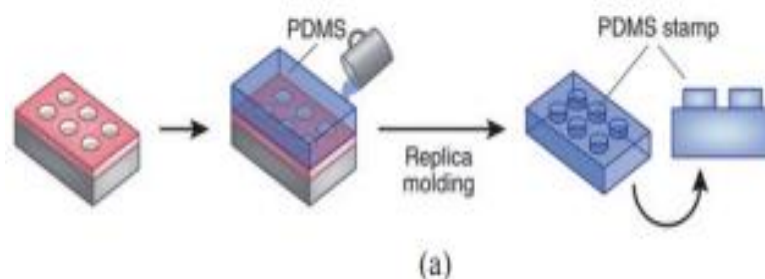
Fonte: Autoria própria, 2024

3.3. Manufatura do chip em PDMS

Para a fabricação dos chips foi escolhido o polímero polidimetilsiloxano (PDMS) que é um elastômero a base de silício que possui propriedades interessantes como elasticidade, transparência óptica, biocompatibilidade, baixa autofluorescência, excelente estabilidade térmica e química, etc. (BECKER; LOCASCIO, 2002; BOWEN; CHENELER; ROBINSON, 2012; MATA; FLEISCHMAN; ROY, 2005; RAJ M; CHAKRABORTY, 2020). Atualmente, utiliza-se o PDMS para dispositivos microfluídicos pela rapidez e facilidade que este material permite a criação de microcanais (GALE et al., 2018; JONG; LAMMERTINK; WESSLING, 2006; MCDONALD et al., 2000). Assim, forma-se um chip unindo o elastômero a um substrato sólido ou flexível, como vidro ou silício. Tal método de união é conhecido como tecnologia de ligação em que substratos a base de silício passam por uma ativação de superfície que sela os microcanais uma vez que ligações químicas irreversíveis são formadas entre o PDMS funcionalizado e a superfície do substrato também funcionalizada. (BECKER; GÄRTNER, 2000; BORÓK; LABODA; BONYÁR, 2021; BROWN et al., 2006; SACKMANN; FULTON; BEEBE, 2014; SIA; WHITESIDES, 2003).

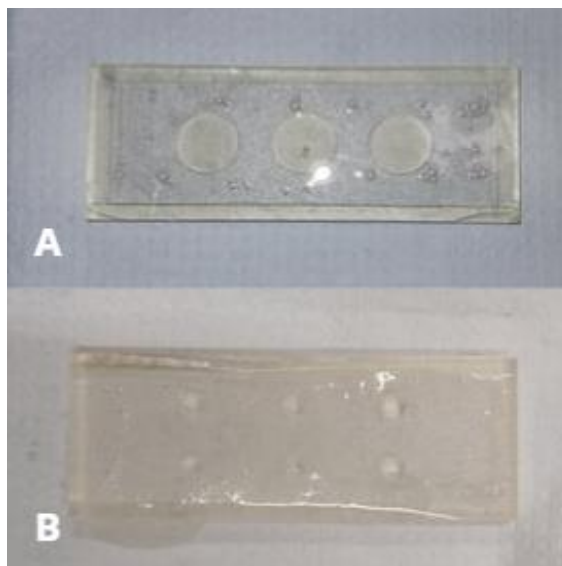
Tendo isso em vista, foi medido o volume dos moldes em questão e foi elaborada uma solução constituída de PDMS e um agente de cura, inicialmente composta por 90% de polímero e 10% do agente catalisador (SYLGARD™ 184 Silicone Elastomer Curing Agent). Em seguida, a mistura foi cuidadosamente inserida em cada molde, permitindo que o elastômero adquirisse a forma específica de cada chip como demonstrado nas Figura 11 e a Figura 12.

Figura 11- Técnicas e aplicação de microfabricação (a) Uso de moldagem de réplica para produção do “carimbo” de PDMS



Fonte: Adaptado de (WANG et al., 2015)

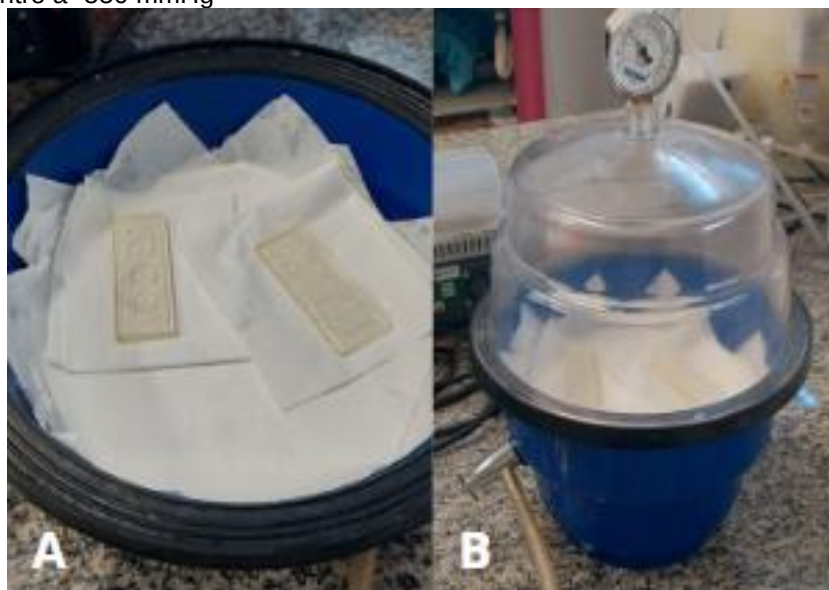
Figura 12- Molde de resina com mistura de PDMS e curador com bolhas (A) Molde de 3 poços (B) Molde de 6 poços



Fonte: Autoria própria, 2024

Posteriormente, os moldes contendo a mistura de PDMS e o agente de cura foram submetidos a um processo de pressurização por uma hora, mantendo uma pressão de -550 mmHg para assegurar a retirada das bolhas formadas na mistura da solução de PDMS com o curador.

Figura 13- Moldes de resina com a solução de PDMS e agente de cura com bolhas (B) Pressurizador com moldes dentro a -550 mmHg



Fonte: Autoria própria, 2024

Feito isso, os moldes com o polímero foram mantidos em uma estufa aquecida por, no mínimo, 4 horas a 65°C para endurecer o material e auxiliar no processo de catálise da cura do elastômero e retirada de água.

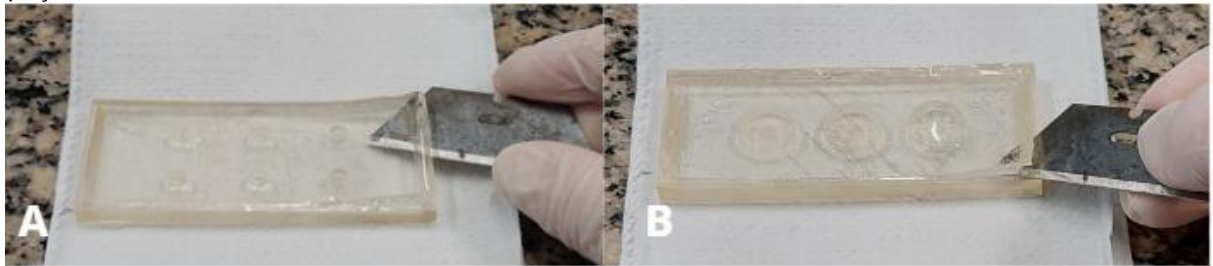
Figura 14- Moldes com PDMS na estufa



Fonte: Autoria própria, 2024

Por fim, o material endurecido foi retirado do molde com ajuda de uma lâmina e álcool isopropílico.

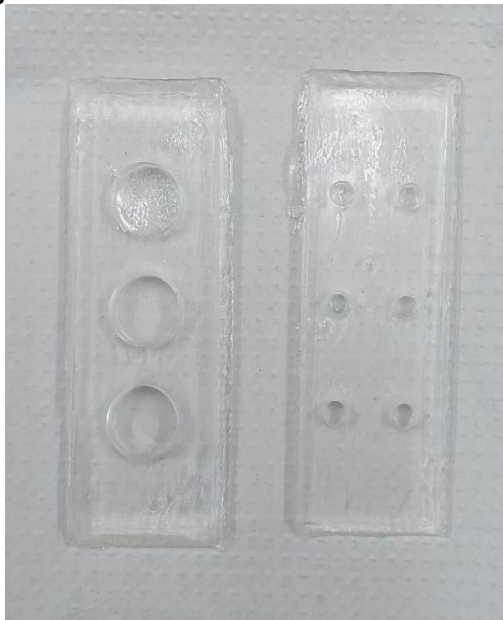
Figura 15- Retirada do elastômero PDMS de dentro do molde de resina com uso de uma lâmina de gilete e álcool isopropílico. (A) Retirada do polímero de 6 poços (B) Retirada do polímero de 3 poços



Fonte: Autoria própria, 2024

Feito isso, as regiões designadas para a entrada de fluídos foram perfuradas com uma caneta perfuradora de 0,2mm.

Figura 16- PDMS endurecido retirado do molde



Fonte: Autoria própria, 2024

Figura 17- Perfuração do polímero com três poços com caneta perfuradora

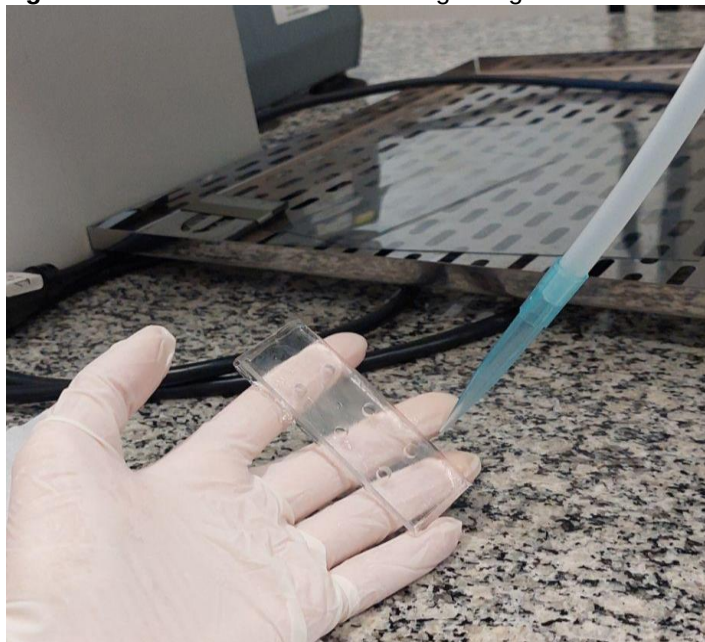


Fonte: Autoria própria, 2024

Logo após, nitrogênio gasoso é propelido nos polímeros e lâminas para retirada de resíduos presentes (Figura 18) e ambos são levados a um forno de fusão ozônio durante 5 min juntamente com a base do chip, que se trata de uma lâmina de microscopia (Figura 19). Esta técnica trata-se de uma ativação de superfície em que o forno utiliza ozônio para gerar ondas ultravioleta. As ondas interagem com a superfície tanto do PDMS quanto do vidro, e removem os átomos de hidrogênio

permitindo que o elastômero faça ligações covalentes com a base de silício, como demonstra a Figura 20.

Figura 18- Polímero recebendo nitrogênio gasoso



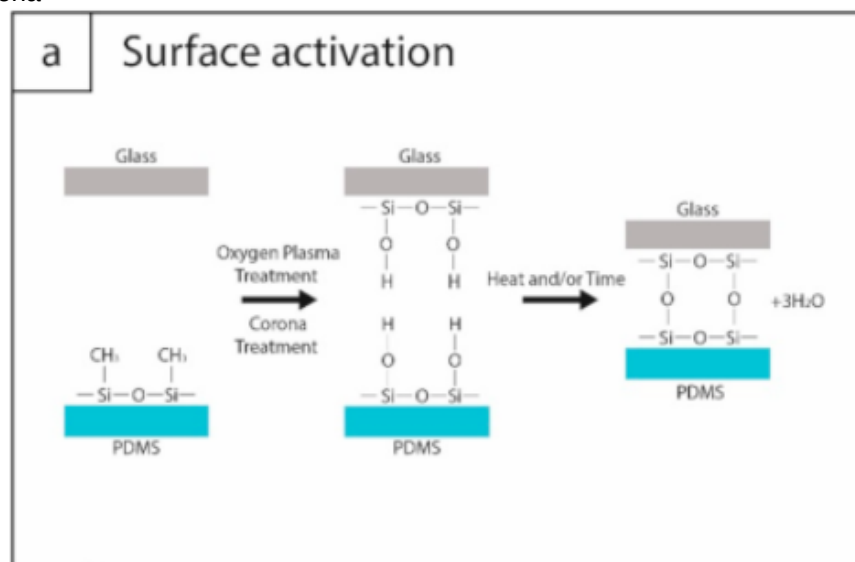
Fonte: Autoria própria, 2024

Figura 19- Lâmina e polímero de PDMS no forno de fusão de ozônio



Fonte: Autoria própria, 2024

Figura 20- Ilustração das etapas do processo de (a) ativação de superfície com plasma de oxigênio ou tratamento corona



Fonte: Adaptado de (BORÓK; LABODA; BONYÁR, 2021)

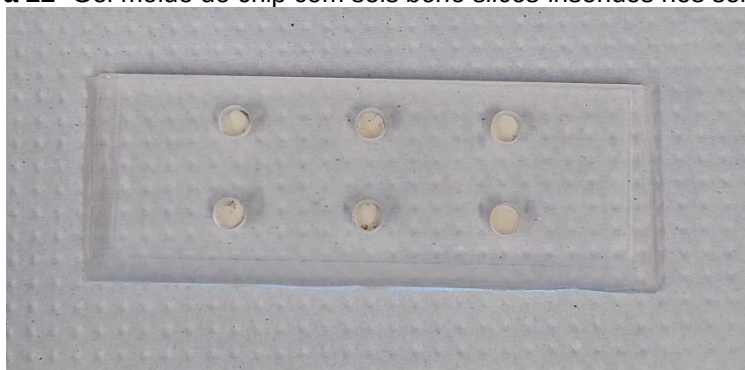
Por último, o polímero e o vidro são unidos manualmente e pressionados para sua adesão, mas antes, as fatias de ossos (*bone slices*) são introduzidas nos poços destinados a eles previamente calculados. Assim, foi feita uma pressão manual para auxiliar no processo de ligação do elastômero à lâmina de vidro, obtendo os *Bone-on-a-chip* desejados.

Figura 21- Gel molde do chip com três *bone slices* inseridos nos três poços



Fonte: Autoria própria, 2024

Figura 22- Gel molde do chip com seis *bone slices* inseridos nos seis poços



Fonte: Autoria própria, 2024

Figura 23- *Bone-on-a-chip* com três poços pronto



Fonte: Autoria própria, 2024

Figura 24- *Bone-on-a-chip* com seis poços pronto



Fonte: Autoria própria, 2024

3.4. Produção de *boneslices* a partir de *scaffolds* biológicos

Os discos ósseos, ou *bone slices*, foram obtidos de fragmentos ósseos oriundos de ossos bovinos de açougues da região. A princípio eles foram limpos com a utilização de lâmina de bisturi, raspadores e escova com cerdas para limpeza juntamente com detergente e água para retirar os fragmentos de carnes restantes.

Pensando na produção de *boneslices* para inserção nos chips, foi utilizado o protocolo de descelularização de Amirazad (2022, p. 1). Existem vários tipos de descelularização, as quais podem envolver técnicas físicas, químicas e a descelularização por perfusão. Neste projeto, foram utilizadas as técnicas físicas e químicas: dois grupos foram separados, um para passar pelo tratamento térmico e outro para passar pelo tratamento térmico e químico (híbrido). Os grupos foram separados visando comparar a eficácia de cada método de descelularização.

O uso de métodos baseados em pressão e temperatura, causa lise celular, destrói as proteínas da matriz e elimina o material genético (GULER et al., 2017). Logo, foram feitos cinco ciclos de congelamento e descongelamento que variavam de -80 °C e 37 °C em ambos os grupos de ossos. Como descreve Guler (2017, p. 540–547), normalmente são necessários de dois a três ciclos de congelamento e descongelamento para uma descelularização eficaz. As vantagens deste método são a redução do uso de produtos químicos e a preservação da ultraestrutura da matriz extracelular, porém pode realizar uma descelularização incompleta (GILPIN; YANG, 2017).

Feita a descelularização celular térmica, o grupo referente ao tratamento híbrido, passou pelo tratamento químico com a utilização de um detergente iônico, o dodecilsulfato de sódio (SDS) que elimina núcleos celulares, DNA celular, quebra as ligações proteína-proteína e destrói o colágeno em diferentes tecidos e órgãos (AMIRAZAD; DADASHPOUR; ZARGHAMI, 2022; NAKAMURA et al., 2019). Ele é altamente efetivo na descelularização, porém pode danificar a MEC e glicosaminoglicanos presentes (JIANG et al., 2021). Percebeu-se que ambas as técnicas de descelularização (térmica e híbrida) foram eficientes.

Em seguida, iniciou-se a fase de perfuração dos ossos para a obtenção dos discos ósseos de interesse. Utilizou-se uma furadeira serra copo de 12mm para os discos ósseos de 12mm e uma broca para obter os discos de 4mm.

Com os fragmentos ósseos em mãos, foi necessário cortá-los ao meio devido ao grande comprimento obtido com a perfuração inicial (Figura 26). Assim, cada pedaço foi cortado ao meio com uma serra micro retífica e posteriormente, eles foram lixados com uma lixa d'água para adquirirem o formato de disco de aproximadamente 3mm e 2mm de altura. A Figura 25 ilustra o passo a passo de produção dos *bone slices*.

Figura 25- Etapas de criação dos scaffolds. A: Ossos bovinos após remoção da carne residual. B: Congelamento dos dois grupos. C: Descongelamento dos ossos. D: Tratamento químico com SDS no grupo híbrido. E: Perfuração óssea com furadeira. F: Osso compacto de fêmur bovino perfurado. G: Fragmento ósseo trabecular com córtex compacto. H: Divisão no meio de cada fragmento ósseo. I: Fragmento ósseo compacto dividido ao meio.



Fonte: Autoria própria, 2023

Figura 26- Fragmentos ósseos de 4mm de diâmetro oriundos da perfuração da broca antes de serem repartidos ao meio



Fonte: Autoria própria, 2023

Figura 27- Disco ósseo de 14mm de diâmetro após ser lixado



Fonte: Autoria própria, 2023

Figura 28- Disco ósseo de 14mm de diâmetro após ser lixado



Fonte: Autoria própria, 2023

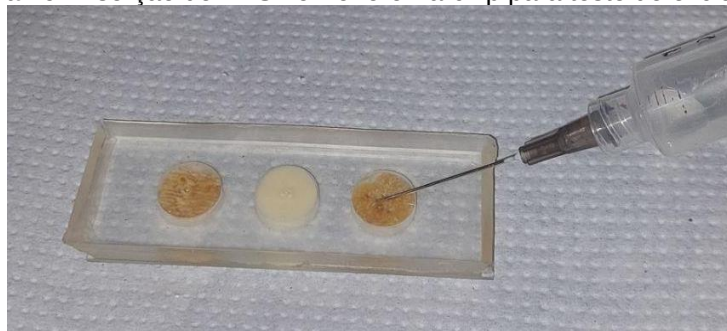
3.5. Testes de introdução de fluídos no chip

Com o *Bone-on-a-chip* devidamente pronto, as microvilosidades dele foram testadas a partir de testes de introdução de fluidos com o objetivo de examinar a eficiência do chip em termos de compor cada poço com um *bone slice* e fluidos referente ao meio de cultura dentro do sistema. Mas também, esse teste serve para analisar a qualidade do chip e decidir se ele pode ou não ser utilizado devido ao processamento prévio.

Quando as etapas anteriores falham em eficiência, é possível que os fluidos escapem do poço designado. Como aconteceu em alguns testes, a pouca aderência do elastômero à lâmina causou o extravasamento entre tais camadas em alguns pontos, o que inviabiliza a utilização de certos poços ou do chip inteiro. Além disso, a proporção de PMDS e agente de cura influenciou na uniformidade do chip, que algumas vezes, se apresentava mole demais e com aspecto de molhado em alguns pontos, o que é causa de uma mistura insuficiente da solução, baixa temperatura da estufa e/ou pouco agente catalisador.

Essa etapa consiste na injeção de água e PBS, solução tamponada com fosfato para cultura celular, no disco ósseo através do orifício feito com o auxílio de uma seringa.

Figura 29- Inserção de PBS no Bone-on-a-chip para teste de eficiência



Fonte: Autoria própria, 2024

3.6. Ensaio de evaporação de líquidos no BoC

Por ser uma tecnologia nova e não padronizada, e por este modelo ter sido desenhado especificamente para esta pesquisa, não há dados conhecidos sobre o cultivo celular específico utilizando este exemplar. Logo, foram feitos ensaios de evaporação de água e de PBS para verificar o tempo de evaporação dos líquidos na plataforma do *Bone-on-a-chip*.

Primeiramente, foi testada a evaporação do líquido inserido nos poços e com gotas em cima dos poros de entrada de fluidos dois modelos de chip por 17 horas em uma estufa de 45°C. Percebeu-se que parte da solução das gotas evaporou no chip de 6 poços, contudo ainda havia a solução dentro deles. Já no chip de 3 poços, foi visto que em um poço a gota de cima havia secado, mas nos restantes não. Também bolhas foram formadas dentro dos poços devido a temperatura.

Percebeu-se então a necessidade de evitar com que bolhas fossem formadas dentro dos poços, já que se tal fato ocorrer, inviabiliza a manutenção de células vivas neste microambiente. Dessa forma, foi testado três técnicas de manutenção da solução nos poços: uma com uma gota grande em cima de cada poço como testado anteriormente, outra com os chips imersos em solução tampão, e por fim, com um reservatório de meio de cultura em cima de cada poço. Todas as estratégias foram feitas com os chips dentro de uma Placa de Petri fechada e estas dentro de uma estufa com temperatura de 37°C.

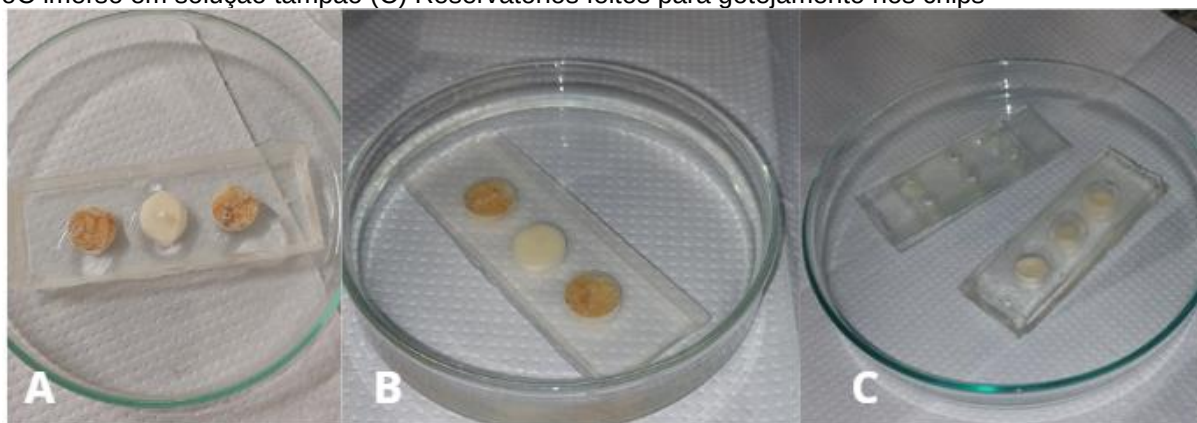
A primeira técnica foi testada pensando que conforme o meio for sendo evaporado pela temperatura da estufa, a gota colocada em cima de cada poço iria ser “puxada” para dentro devido propriedade de coesão da água, que garante que a substância permaneça unida devido às pontes de hidrogênio presentes nas moléculas de água. Após 12 horas as gotas não evaporaram, havia líquido nos poços, mas alguns deles tinham o aspecto de “suado” internamente por causa da evaporação.

A segunda técnica foi realizada tendo em vista a questão da evaporação interna e a necessidade de haver um meio de cultura dentro dos poços para manter as células vivas. Dessa maneira, os BoC foram imersos com a solução tampão de PBS para simular o meio de cultura que será utilizado nos ensaios biológicos. Depois de 24 horas, foi verificado que o meio ainda estava presente dentro e fora dos poços dos chips.

Finalmente, reservatórios para meio de cultura foram testados. Moldes de PDMS de cada modelo foram feitos da mesma forma que são feitos para produzir os chips, contudo, não foram fixados em nenhum molde e seus poços foram colocados voltados para “cima” e cobertos com a solução tampão para o gotejamento dentro dos poços dos chips. Isto posto, ensaios de 24 horas foram feitos e foi verificado que no BoC de seis poços, a solução de seu reservatório evaporou, parte não caiu dentro do

chip, mas ainda havia solução dentro de cada poço, já com o BoC de três poços ainda havia solução dentro do poços do chip e de seu reservatório.

Figura 30- Teste de evaporação com diferentes técnicas de cultura (A) Gotas em cima dos poços (B) BoC imerso em solução tampão (C) Reservatórios feitos para gotejamento nos chips

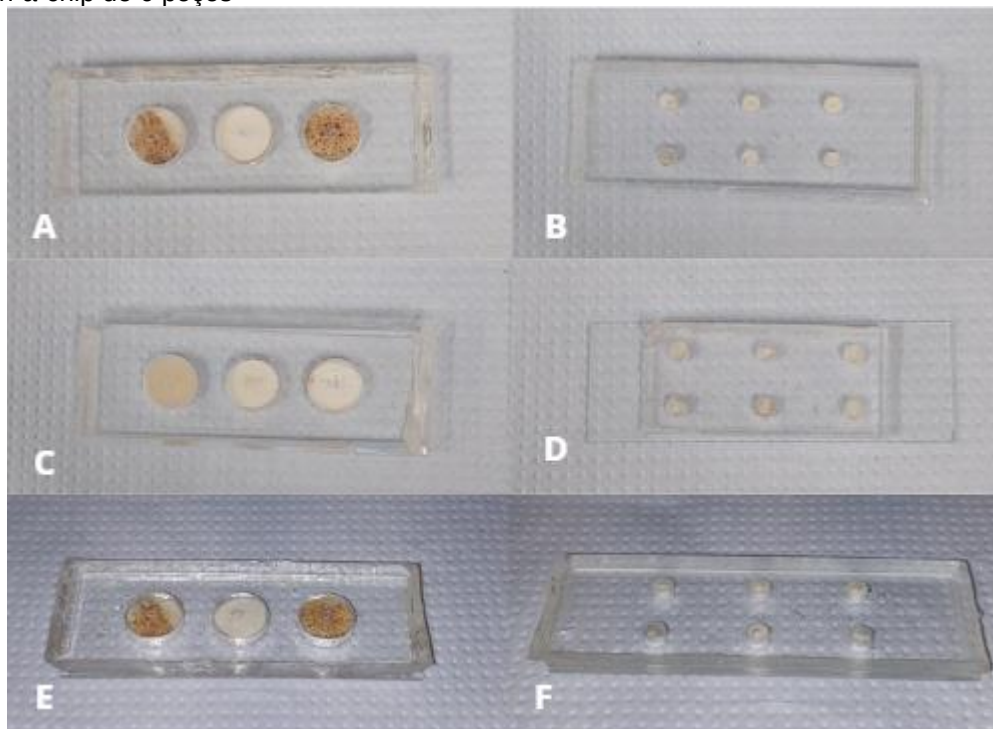


Fonte: Autoria própria, 2024

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. Manufatura do chip em PDMS

Figura 31- Modelos de Bone-on-a-chip estático (A),(C),(E): Bone-on-a-chip de 3 poços (B), (D), (F): Bone-on-a-chip de 6 poços



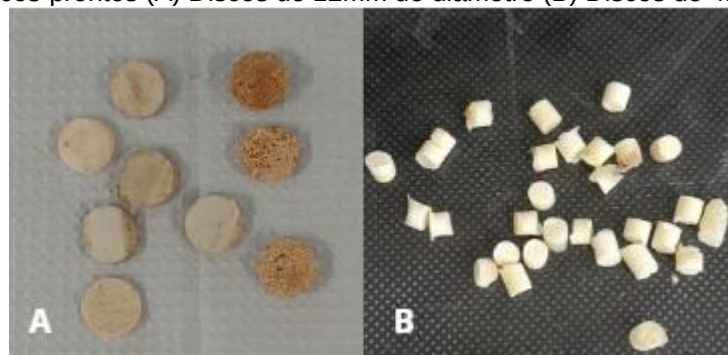
Fonte: Autoria própria, 2024

Para produzir a manufatura do chip em PDMS foram necessárias diversas tentativas com acertos e erros ao longo desta pesquisa. É importante destacar que, ao longo de diversos ensaios feitos com diferentes modelos de moldes, a proporção 9:1 de elastômero e agente de cura foi modificada devido a diversos fracassos em conseguir atingir a textura ideal do silicone. Muitas vezes, o elastômero quando retirado do molde estava mole, meio líquido. Posteriormente, a proporção de 87% PDMS e 13% agente de cura foi testada e as réplicas dos moldes feitas com elastômero saíram mais endurecidas e homogêneas, viáveis de serem utilizadas.

Adiciona-se aqui o fato de que, mesmo com a nova proporção, quantidade de tempo suficiente na estufa, o polímero saía heterogêneo, irregular e inviável de ser utilizado. Por fim, foi descoberto que a temperatura indicada pela estufa não era a temperatura real interna, estava abaixo da temperatura esperada de 65°C. Assim, com um termômetro a temperatura da estufa foi ajustada e destarte, os elastômeros adquiriram a textura ideal para os chips.

4.2. Produção de *bone slices* a partir de scaffolds biológicos

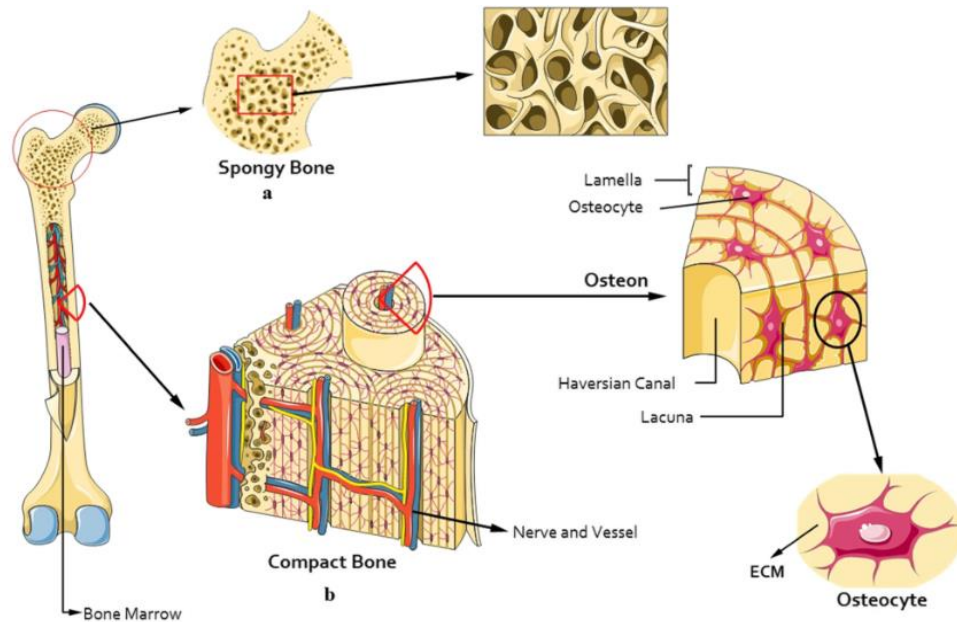
Figura 32- *Bone slices* prontos (A) Discos de 12mm de diâmetro (B) Discos de 4mm de diâmetro



Fonte: Autoria própria, 2023

Com os discos ósseos em mãos, devidamente cortados e lixados, foi possível observar algumas diferenças estruturais dos fragmentos obtidos. Alguns eram trabeculares, com poros em sua estrutura e outros eram compactos, maciços originados do córtex ósseo. A Figura 33 ilustra detalhadamente as diferentes estruturas presentes neste órgão.

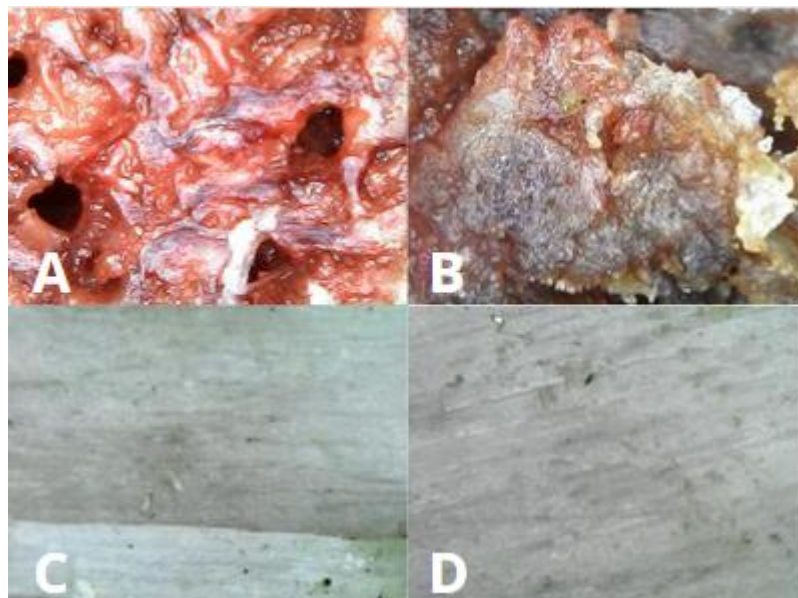
Figura 33-Explicação da estrutura óssea. Dois tipos principais de osso incluem osso esponjoso (trabecular ou esponjoso) e osso compacto (cortical). (a) O osso esponjoso é altamente poroso. (b) O osso compacto consiste em ósteon ou sistema haversiano, circundado pela lamela que é composta por nervos e vasos sanguíneos.



Fonte: (AMIRAZAD; DADASHPOUR; ZARGHAMI, 2022)

Assim, foi possível observar com um microscópio eletrônico, as diferentes características provenientes de fragmentos de regiões distintas do órgão (Figura 34).

Figura 34- Microscopia eletrônica do osso esponjoso/trabecular (A) e (B) e do osso compacto/cortical (C) e (D).



Fonte: Autoria própria, 2023

Neste contexto, questiona-se a igualdade do processo de reabsorção matricial óssea dos osteoclastos e formação dos *pits* nos diferentes tecidos (trabecular e compacto). Em virtude de o osso esponjoso já ser poroso, há a possibilidade de que os “buracos” esperados a partir da ação dos osteoclastos sejam mais presentes no osso do tipo trabecular, além disso, há uma facilidade de produzir uma abertura em um lugar onde já possui depressões. No entanto, o osso cortical, por ser mais íntegro e, espera-se que o processo de reabsorção da matriz óssea seja mais prolongado.

4.3. Ensaio de evaporação de líquidos no BoC

Após a realização dos ensaios de evaporação de líquidos nos BoC com os métodos descritos anteriormente, acredita-se que a primeira e a terceira técnica (da gota por cima e do reservatório) não sejam tão seguros para a manutenção da sobrevivência das células. A evaporação interna em alguns poços e o escape de parte da solução para fora dos poços, respectivamente comprovam isso. Portanto, acredita-se ser mais seguro para o cultivo celular o método de imersão dos chips na solução tampão pela maior garantia da presença de fluidos e sobrevivência das células.

5. CONCLUSÕES

Em suma, esta pesquisa demonstrou a viabilidade e eficácia da aplicação da tecnologia *Organ-on-a-chip* no contexto do modelo ósseo, conhecido como *Bone-on-a-chip* (BoC). Apesar dos desafios encontrados durante o processo de fabricação dos chips, os exemplares produzidos foram utilizados de forma eficiente neste estudo. Embora alguns tenham apresentado defeitos, como textura inconsistente do elastômero e aderência incompleta do polímero à lâmina de vidro, sua utilização foi suficiente para conduzir os ensaios biológicos planejados. Como resultado, confirmamos que nosso objetivo de desenvolver um *Organ-on-a-chip* funcional para investigações *in vitro* da remodelação óssea, visando a avaliação da atividade dos osteoclastos, foi alcançado.

Espera-se contribuir significativamente para o avanço da pesquisa em engenharia de tecidos e áreas correlatas, possibilitando futuras investigações mais precisas e detalhadas, especialmente no campo da remodelação óssea e na cultura de células de osteoclastos. É possível vislumbrar o potencial dessa tecnologia para

impulsionar novas descobertas e aplicações clínicas, beneficiando assim a saúde humana.

6. PERSPECTIVAS FUTURAS

Serão realizados ensaios biológicos com o cultivo de osteoclastos oriundos de monócitos nos BoC desenvolvidos. Será fornecido condições para o ensaio de movimentação de osteoclastos, em um período de até 72 horas de cultura celular, e também será testado a adição de ácido ortosilícico o qual vem sendo descrito na literatura como um inibidor da atividade de osteoclastos (MA et al., 2021; YOU et al., 2021)

Logo, este chip também permitirá a possibilidade de realização de ensaios celulares e inserção de outros meios de cultura condicionados com biomateriais visando futuras aplicações dentro da linha de pesquisa do laboratório de Bioensaios e Dinâmica Celular.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

AMIRAZAD, H.; DADASHPOUR, M.; ZARGHAMI, N. Application of decellularized bone matrix as a bioscaffold in bone tissue engineering. **Journal of Biological Engineering**, v. 16, n. 1, p. 1, 5 jan. 2022.

AZIZIPOUR, N. et al. Evolution of Biochip Technology: A Review from Lab-on-a-Chip to Organ-on-a-Chip. **Micromachines**, v. 11, n. 6, p. 599, jun. 2020.

BECKER, H.; GÄRTNER, C. Polymer microfabrication methods for microfluidic analytical applications. **ELECTROPHORESIS**, v. 21, n. 1, p. 12–26, 2000.

BECKER, H.; LOCASCIO, L. E. Polymer microfluidic devices. **Talanta**, v. 56, n. 2, p. 267–287, 11 fev. 2002.

BORÓK, A.; LABODA, K.; BONYÁR, A. PDMS Bonding Technologies for Microfluidic Applications: A Review. **Biosensors**, v. 11, n. 8, p. 292, ago. 2021.

BOWEN, J.; CHENELER, D.; ROBINSON, A. P. G. Direct e-beam lithography of PDMS. **Microelectronic Engineering**, Micro- and Nano-Engineering (MNE) 2011, selected contributions: Part I. v. 97, p. 34–37, 1 set. 2012.

BROWN, L. et al. Fabrication and characterization of poly(methylmethacrylate) microfluidic devices bonded using surface modifications and solvents. **Lab on a Chip**, v. 6, n. 1, p. 66–73, 2006.

CARVALHO, V. et al. 3D Printing Techniques and Their Applications to Organ-on-a-Chip Platforms: A Systematic Review. **Sensors**, v. 21, n. 9, p. 3304, jan. 2021.

CHARLES, J. F.; ALIPRANTIS, A. O. Osteoclasts: more than ‘bone eaters’. **Trends in Molecular Medicine**, v. 20, n. 8, p. 449–459, 1 ago. 2014.

CONG, Y. et al. Drug Toxicity Evaluation Based on Organ-on-a-chip Technology: A Review. **Micromachines**, v. 11, n. 4, p. 381, abr. 2020.

DANKU, A. E. et al. Organ-On-A-Chip: A Survey of Technical Results and Problems. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 10, 2022.

DONG, M. et al. Biological Silicon Stimulates Collagen Type 1 and Osteocalcin Synthesis in Human Osteoblast-Like Cells Through the BMP-2/Smad/RUNX2 Signaling Pathway. **Biological Trace Element Research**, v. 173, n. 2, p. 306–315, 1 out. 2016.

FERRAZ, M. A. M. M. et al. An oviduct-on-a-chip provides an enhanced in vitro environment for zygote genome reprogramming. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 4934, 22 nov. 2018.

FERREIRA, L. P.; GASPAR, V. M.; MANO, J. F. Design of spherically structured 3D in vitro tumor models -Advances and prospects. **Acta Biomaterialia**, v. 75, p. 11–34, 15 jul. 2018.

GALE, B. K. et al. A Review of Current Methods in Microfluidic Device Fabrication and Future Commercialization Prospects. **Inventions**, v. 3, n. 3, p. 60, set. 2018.

GEORGE, E. L. et al. Lab-on-a-chip platforms for quantification of multicellular interactions in bone remodeling. **Experimental Cell Research**, v. 365, n. 1, p. 106–118, 1 abr. 2018.

GILPIN, A.; YANG, Y. Decellularization Strategies for Regenerative Medicine: From Processing Techniques to Applications. **BioMed Research International**, v. 2017, p. e9831534, 30 abr. 2017.

GU, B. K. et al. 3-dimensional bioprinting for tissue engineering applications. **Biomaterials Research**, v. 20, n. 1, p. 12, 25 abr. 2016.

GULER, S. et al. Supercritical Carbon Dioxide-Assisted Decellularization of Aorta and Cornea. **Tissue Engineering Part C: Methods**, v. 23, n. 9, p. 540–547, set. 2017.

GUMUSCU, B. et al. Large scale patterning of hydrogel microarrays using capillary pinning. **Lab on a Chip**, v. 15, n. 3, p. 664–667, 2015.

GUO, J. et al. Robust and Long-Term Cellular Protein and Enzymatic Activity Preservation in Biomineralized Mammalian Cells. **ACS Nano**, v. 16, n. 2, p. 2164–2175, 22 fev. 2022.

HARRISON, D. JED. et al. Capillary electrophoresis and sample injection systems integrated on a planar glass chip. **Analytical Chemistry**, v. 64, n. 17, p. 1926–1932, 1 set. 1992.

Analytical chemistry, v. 64, n. 17, p. 1926-1932, 1992.

HAY, M. et al. Clinical development success rates for investigational drugs. **Nature Biotechnology**, v. 32, n. 1, p. 40–51, jan. 2014.

JAZAYERI, H. E. et al. A current overview of materials and strategies for potential use in maxillofacial tissue regeneration. **Materials Science and Engineering: C**, v. 70, p. 913–929, 1 jan. 2017.

JIANG, Y. et al. Extracellular matrix grafts: From preparation to application (Review). **International Journal of Molecular Medicine**, v. 47, n. 2, p. 463–474, 1 fev. 2021.

JONG, J. DE; LAMMERTINK, R. G. H.; WESSLING, M. Membranes and microfluidics: a review. **Lab on a Chip**, v. 6, n. 9, p. 1125–1139, 23 ago. 2006.

JUNQUEIRA, L. C. U. et al. *Biologia celular e molecular*. 2005.

KO, J. et al. Engineering Organ-on-a-Chip to Accelerate Translational Research. **Micromachines**, v. 13, n. 8, p. 1200, 28 jul. 2022.

LEE, B. et al. 3D micromesh-based hybrid bioprinting: multidimensional liquid patterning for 3D microtissue engineering. **NPG Asia Materials**, v. 14, n. 1, p. 1–10, 21 jan. 2022.

LEE, K. S.; RAM, R. J. Plastic–PDMS bonding for high pressure hydrolytically stable active microfluidics. **Lab on a Chip**, v. 9, n. 11, p. 1618–1624, 7 jun. 2009.

LEUNG, C. M. et al. A guide to the organ-on-a-chip. **Nature Reviews Methods Primers**, v. 2, n. 1, p. 1–29, 12 maio 2022.

LI, G. et al. Nanomaterials for Craniofacial and Dental Tissue Engineering. **Journal of Dental Research**, v. 96, n. 7, p. 725–732, 1 jul. 2017.

LOW, L. A. et al. Organs-on-chips: into the next decade. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 20, n. 5, p. 345–361, maio 2021.

LU, Y. et al. Recent advances in cell sheet technology for bone and cartilage regeneration: from preparation to application. **International Journal of Oral Science**, v. 11, n. 2, p. 1–13, 21 maio 2019.

MA, W. et al. Ortho-silicic Acid Inhibits RANKL-Induced Osteoclastogenesis and Reverses Ovariectomy-Induced Bone Loss In Vivo. **Biological Trace Element Research**, v. 199, n. 5, p. 1864–1876, 1 maio 2021.

MANSOORIFAR, A. et al. Bone-on-a-Chip: Microfluidic Technologies and Microphysiologic Models of Bone Tissue. **Advanced Functional Materials**, v. 31, n. 6, p. 2006796, 2021.

MANZ, A.; GRABER, N.; WIDMER, H. M. Miniaturized total chemical analysis systems: A novel concept for chemical sensing. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 1, n. 1, p. 244–248, 1 jan. 1990.

MASCHMEYER, I.; KAKAVA, S. Organ-on-a-Chip. Em: BAHNEMANN, J.; GRÜNBERGER, A. (Eds.). **Microfluidics in Biotechnology**. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology. Cham: Springer International Publishing, 2022. p. 311–342

MATA, A.; FLEISCHMAN, A. J.; ROY, S. Characterization of Polydimethylsiloxane (PDMS) Properties for Biomedical Micro/Nanosystems. **Biomedical Microdevices**, v. 7, n. 4, p. 281–293, 1 dez. 2005.

MCDONALD, J. C. et al. Fabrication of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane). **ELECTROPHORESIS**, v. 21, n. 1, p. 27–40, 2000.

NAKAMURA, N. et al. Induction of in Vivo Ectopic Hematopoiesis by a Three-Dimensional Structured Extracellular Matrix Derived from Decellularized Cancellous Bone. **ACS Biomaterials Science & Engineering**, v. 5, n. 11, p. 5669–5680, 11 nov. 2019.

PARK, S. E.; GEORGESCU, A.; HUH, D. Organoids-on-a-chip. **Science**, v. 364, n. 6444, p. 960–965, 7 jun. 2019.

RAJ M, K.; CHAKRABORTY, S. PDMS microfluidics: A mini review. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 137, n. 27, p. 48958, 2020.

ROSETI, L. et al. Scaffolds for Bone Tissue Engineering: State of the art and new perspectives. **Materials Science and Engineering: C**, v. 78, p. 1246–1262, 1 set. 2017.

RUSSELL WMS, BURCH RL. 1959. ***The Principles of Humane Experimental Technique***. Wheathamsted, UK: : Universities Federation for Animal Welfare, (reprinted 1992).

SACKMANN, E. K.; FULTON, A. L.; BEEBE, D. J. The present and future role of microfluidics in biomedical research. **Nature**, v. 507, n. 7491, p. 181–189, mar. 2014.

SEOK, J. et al. Genomic responses in mouse models poorly mimic human inflammatory diseases. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 9, p. 3507–3512, 26 fev. 2013.

SIA, S. K.; WHITESIDES, G. M. Microfluidic devices fabricated in Poly(dimethylsiloxane) for biological studies. **ELECTROPHORESIS**, v. 24, n. 21, p. 3563–3576, 2003.

SINGH, D. et al. Journey of organ on a chip technology and its role in future healthcare scenario. **Applied Surface Science Advances**, v. 9, p. 100246, 1 jun. 2022.

TURNBULL, G. et al. 3D biofabrication for soft tissue and cartilage engineering.

Medical Engineering & Physics, v. 82, p. 13–39, 1 ago. 2020.

TEITELBAUM, S. L. Bone Resorption by Osteoclasts. **Science**, v. 289, n. 5484, p. 1504–1508, set. 2000.

VESPREY, A.; YANG, W. Pit Assay to Measure the Bone Resorptive Activity of Bone Marrow-derived Osteoclasts. **BIO-PROTOCOL**, v. 6, n. 12, 2016.

VI, L. et al. Macrophages Promote Osteoblastic Differentiation In Vivo: Implications in Fracture Repair and Bone Homeostasis. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 30, n. 6, p. 1090–1102, 2015.

WANG, D. Z. et al. Organ-on-a-Chip Platforms for Drug Delivery and Cell Characterization: A Review. **Sensors and Materials**, v. 27, 1 jan. 2015.

WARING, M. J. et al. An analysis of the attrition of drug candidates from four major pharmaceutical companies. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 14, n. 7, p. 475–486, jul. 2015.

WHITESIDES, G. M. The origins and the future of microfluidics. **Nature**, v. 442, n. 7101, p. 368–373, jul. 2006.

YOU, Y. et al. Ortho-silicic acid enhances osteogenesis of osteoblasts through the upregulation of miR-130b which directly targets PTEN. **Life Sciences**, v. 264, p. 118680, 1 jan. 2021.

ZHANG, K. et al. Advanced smart biomaterials and constructs for hard tissue engineering and regeneration. **Bone Research**, v. 6, n. 1, p. 1–15, 22 out. 2018.