

ELTON DIÊGO BONIFÁCIO

**MODELAGEM COMPUTACIONAL DE CULTURA DE
CÉLULAS TUMORAIS EM DISPOSITIVOS DE
MICROFLUÍDICA UTILIZANDO O MÉTODO DOS
ELEMENTOS FINITOS**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE ENGENHARIA MECÂNICA**

2023

MODELAGEM COMPUTACIONAL DE CULTURA DE CÉLULAS TUMORAIS EM DISPOSITIVOS DE MICROFLUÍDICA UTILIZANDO O MÉTODO DOS ELEMENTOS FINITOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Mecânica da Universidade Federal de Uberlândia, como parte dos requisitos para a obtenção do título de **DOUTOR EM ENGENHARIA MECÂNICA**.

Área de Concentração: Mecânica dos Sólidos e Vibrações

Orientador: Prof. Dr. Cleudmar Amaral de Araújo

Coorientador: Prof. Dr. Libardo Andrés González Torres

UBERLÂNDIA – MG

2023

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

B715 2023	<p>Bonifácio, Elton Diêgo, 1985- MODELAGEM COMPUTACIONAL DE CULTURA DE CÉLULAS TUMORAIS EM DISPOSITIVOS DE MICROFLUÍDICA UTILIZANDO O MÉTODO DOS ELEMENTOS FINITOS [recurso eletrônico] / Elton Diêgo Bonifácio. - 2023.</p> <p>Orientador: Cleudmar Amaral de Araújo. Coorientador: Libardo Andrés González Torres. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-graduação em Engenharia Mecânica. Modo de acesso: Internet. Disponível em: http://doi.org/10.14393/ufu.te.2023.104 Inclui bibliografia. Inclui ilustrações.</p> <p>1. Engenharia mecânica. I. Araújo, Cleudmar Amaral de, 1963-, (Orient.). II. Torres, Libardo Andrés González, 1982-, (Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Engenharia Mecânica. IV. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDU: 621</p>
--------------	--

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:
Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Mecânica
Av. João Naves de Ávila, nº 2121, Bloco 1M, Sala 212 - Bairro Santa Mônica, Uberlândia-MG, CEP 38400-902
Telefone: (34) 3239-4282 - www.posmecanicaufu.com.br - secposmec@mecanica.ufu.br



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Engenharia Mecânica				
Defesa de:	Tese de Doutorado Acadêmico, nº 353, PPGEM				
Data:	28/02/2023	Hora de início:	17:00	Hora de encerramento:	20:15
Matrícula do Discente:	11813EMC004				
Nome do Discente:	Elton Diêgo Bonifácio				
Título do Trabalho:	MODELAGEM COMPUTACIONAL DE CULTURA DE CÉLULAS TUMORAIS EM DISPOSITIVOS DE MICROFLUÍDICA UTILIZANDO O MÉTODO DOS ELEMENTOS FINITOS				
Área de concentração:	Mecânica dos Sólidos e Vibrações				
Linha de pesquisa:	Engenharia Biomecânica				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Processo CNPq 404237/2019-3 "Apoio à modernização da infraestrutura do Centro Brasileiro de Referência em Inovações Tecnológicas para Esportes Paralímpicas"				

Reuniu-se por meio de videoconferência a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Engenharia Mecânica, assim composta: Professores Doutores: Gilmar Guimarães - FEMEC/UFU; Arthur Alves Fiocchi - FEMEC/UFU; Edson Antonio Capello Sousa - UNESP; Rudolf Huebner - UFMG; Libardo Andrés González Torres (coorientador) - UFVJM e Cleudmar Amaral de Araújo - FEMEC/UFU, orientador do candidato.

Iniciando os trabalhos, o presidente da mesa, Dr. Cleudmar Amaral de Araújo, apresentou a Comissão Examinadora e o candidato, agradeceu a presença do público, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

Aprovado.

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Cleudmar Amaral de Araujo, Professor(a) do Magistério Superior**, em 28/02/2023, às 20:20, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Libardo Andrés González Torres, Usuário Externo**, em 28/02/2023, às 20:20, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Arthur Alves Fiocchi, Professor(a) do Magistério Superior**, em 28/02/2023, às 20:20, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Gilmar Guimarães, Professor(a) do Magistério Superior**, em 28/02/2023, às 20:21, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Rudolf Huebner, Usuário Externo**, em 28/02/2023, às 20:21, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Edson Antonio Capello Sousa, Usuário Externo**, em 28/02/2023, às 20:26, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **4283233** e o código CRC **0DD98A3C**.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus pelas graças concedidas em minha vida e por me guiar e amparar em todos momentos.

Agradeço aos meus amados pais pela educação que me deram e por estarem sempre ao meu lado. À minha irmã pela amizade. Agradeço em especial a minha querida esposa Izabel que sempre me incentivou a continuar em frente mesmo em momentos difíceis. Seu amor, carinho e dedicação com nossa família serviram como fonte de inspiração para alcançar esses objetivos. Agradeço aos meus filhos Théo, Luiza e Pedro pelo amor e paciência com a minha ausência em vários momentos.

Ao meu orientador prof. Dr. Cleudmar Amaral de Araújo pela confiança, amizade e pelos seus valiosos conselhos e conhecimentos da vida e da engenharia.

Ao meu coorientador prof. Dr. Libardo Andrés González Torres pelos ensinamentos técnicos, confiança, amizade e pela paciência durante todo o caminho. Agradeço sobretudo pela amizade que se fortaleceu neste período do trabalho.

Agradeço em especial aos professores Dr. Gilmar Guimarães, Dr. Francisco Paulo Lépare Neto (*in memoriam*) e a Dra. Sônia Goulart pelas contribuições na minha formação acadêmica.

Aos meus amigos do LPM que contribuíram de forma direta ou indireta na realização deste trabalho. Em especial gostaria de agradecer aos meus amigos Marcília e Márcio que me auxiliaram em diversas etapas do trabalho e, de forma especial, na leitura e revisão do texto.

À pós-graduação em Engenharia Mecânica pela oportunidade de cursar o mestrado e doutorado em programa de grande reconhecimento e mérito nacional

Aos órgãos CAPES, CNPq, FAPEMIG e FINEP pelo auxílio e recursos concedidos.

À Universidade Federal de Uberlândia e à Faculdade de Engenharia Mecânica pela oportunidade de realizar o curso de Engenharia Mecânica. Agradeço, especialmente, aos professores pelos conhecimentos passados desde a graduação até o doutorado.

BONIFÁCIO, E. D. **MODELAGEM COMPUTACIONAL DE CULTURA DE CÉLULAS TUMORAIS EM DISPOSITIVOS DE MICROFLUÍDICA UTILIZANDO O MÉTODO DOS ELEMENTOS FINITOS**. 2023. 162 f. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.

Resumo

Apesar dos avanços das ciências biomédicas, o câncer continua sendo uma das principais causas de morte no mundo. Interações complexas entre as células tumorais e seu microambiente contribuem para o início e progressão do tumor além do desenvolvimento de células resistentes a drogas. O microambiente tumoral (MT) é altamente complexo, consistindo de uma variação espaço-temporal de moléculas que influenciam diversos processos celulares. Modelar as condições do MT *in vitro* com essa complexidade é um desafio. Modelos animais e modelos tradicionais *in vitro* são limitados em sua capacidade de reproduzir estruturas e funções humanas, dificultando estratégias terapêuticas apropriadas. Avanços na tecnologia de microfluídica têm oferecido oportunidades de mimetizar um MT fisiologicamente relevante observado em tumores *in vivo*. A aplicação de modelos de microfluídica do câncer têm o potencial de superar algumas limitações dos modelos tradicionais. A possibilidade de modelar computacionalmente microchips destinados à análises biológicas representa um avanço no estudo do comportamento celular. Na atualidade não existe um modelo focado no estudo de tumores em dispositivos microfluídicos que contempla o comportamento das células em função da disponibilidade de glicose, O₂ e pH do MT. Diante disso, o objetivo deste trabalho é o desenvolvimento de modelos matemáticos computacionais que simulam aspectos do comportamento de células tumorais, como proliferação e morte, em um dispositivo de microfluídica, em função das condições do MT utilizando o método dos elementos finitos. Para isso, foram implementados modelos para avaliar o padrão espaço-temporal de nutrientes em um microchip em função de alguns parâmetros físicos e propriedades de materiais dos hidrogéis que usualmente variam em experimentos. Em seguida, foi desenvolvido um modelo matemático que inclui a influência da glicose, O₂, dimensões do microchip e produção de resíduos metabólicos no comportamento das células tumorais. Foram avaliados diferentes estudos de casos considerando a variação da densidade inicial de células, regime de renovação do meio de cultura e variação da geometria do chip. Os resultados mostraram uma boa concordância com observações experimentais reportadas na literatura que apresentam a formação do núcleo necrótico decorrente da escassez de nutrientes e acidez do MT sobretudo para condições de elevada densidade inicial de células. Os modelos propostos permitem avaliar como se dá a distribuição de glicose, O₂ e íons de H⁺ no interior de um dispositivo de microfluídica e como influenciam no comportamento da proliferação e morte celular. Portanto, esses modelos são ferramentas que podem auxiliar no planejamento experimental envolvendo sistemas de microfluídica, uma vez que possibilitam analisar uma ampla variedade de experimentos biológicos sem as dificuldades de tempo e consumo de reagentes inerentes às investigações experimentais.

Palavras-Chave: *Dispositivos de Microfluídica; Células Tumorais; Elementos finitos; Bioengenharia; Hidrogel; Gradiente de concentração de nutrientes.*

BONIFÁCIO, E. D. **COMPUTATIONAL MODELING OF TUMOR CELL CULTURE IN MICROFLUIDIC DEVICES USING THE FINITE ELEMENT METHOD.** 2023. 162 f. Thesis, Federal University of Uberlândia, Uberlândia.

Abstract

Despite advances in biomedical sciences, cancer remains one of the leading causes of death in the world. Complex interactions between tumor cells and their microenvironment contribute to tumor initiation and progression in addition to the development of drug-resistant tumor cells. The tumor microenvironment (TM) is heterogeneous and highly complex consisting of a spatial-temporal variation of nutrients, mechanical signals, among others, which influence several cellular processes such as proliferation, differentiation and migration. Modeling TM conditions *in vitro* with this complexity is technically a challenge. Traditional animal cancer models and *in vitro* cancer models are limited in their ability to recapitulate human structures and functions, thus hindering appropriate therapeutic strategies. In this context, recent advances in microfluidic technology have offered opportunities to mimetize a physiologically relevant TM found by tumor cells *in vivo*. The development and application of microfluidic cancer models have the potential to overcome some of the limitations inherent to traditional models. Moreover, the possibility of computationally modeling microchips intended for biological analysis represents an advance in the study of cellular behavior. Currently, there is no model focused on the study of tumor cell cultures in microfluidic devices that contemplates the behavior of cells due to the availability of glucose, oxygen and pH of TM. Therefore, the main objective of this work is the development of computational mathematical models that simulate aspects of tumor cell behavior, such as proliferation and death, inside a microfluidic device, depending on the conditions of TM using the finite element method. For this, models were implemented to evaluate the space-time pattern of nutrients inside a microchip as a function of some physical parameters and material properties that usually vary in experiments. Then, a mathematical model was developed that includes the influence of glucose, oxygen, microchip dimensions and production of metabolic residues on tumor cell behavior. Different case studies were evaluated considering the variation of the initial density of cells, regime of renewal of the culture medium, variation of chip geometry, among others. The results showed a good agreement with experimental observations reported in the literature that present the formation of the necrotic nucleus due to nutrient scarcity and TM acidity, especially for conditions of high initial cell density. The models proposed in this work allow us to evaluate how the distribution of glucose, oxygen and H⁺ ions occurs inside a microfluidic device and how these influence the behavior of cell proliferation and death. Therefore, these models are tools that can help in experimental planning involving microfluidic systems, since they allow analyzing a wide variety of biological experiments without the difficulties of time and consumption of reagents inherent to experimental investigations.

Keywords: *Microfluidic Devices; Tumor Cells; Finite Element Method; Bioengineering; Hydrogel; Nutrient gradient concentration.*

LISTA DE SÍMBOLOS

Símbolo	Significado	
A_0	Patamar de produção de ATP	
b	Variáveis primárias de influência da similitude	
C_i	Concentração do soluto	mol/m ³
D_∞	Coefficiente de difusividade em meio livre	m ² /s
D_{eff}	Coefficiente de difusividade efetiva em meio poroso	m ² /s
D_n	Difusividade celular	m ² /s
D_O	Difusividade do oxigênio	m ² /s
D_G	Difusividade da glicose	m ² /s
D_H	Difusividade dos íons H ⁺	m ² /s
F_p	Funções de proliferação celular	
F_d	Funções de morte celular	
f_p	Função taxas de proliferação	
f_d	Função taxas de morte devido escassez de nutrientes	
f_{dpH}	Função taxas de morte devido acidez	
G	Concentração de glicose	mol/m ³
G_p	Concentração crítica de glicose para proliferação	mol/m ³
G_d	Concentração crítica de glicose para morte celular	mol/m ³
H	Concentração de íons H ⁺	mol/m ³
k_{ap}	Taxa de morte por apoptose	1/s

k_B	Constante de Boltzmann	J/K
k_d	Máxima taxa de morte	1/s
k_g	Taxa de crescimento do tumor	1/s
k_p	Máxima taxa de proliferação	1/s
k_G	Concentração na qual ocorre a metade do consumo de glicose	mol/m ³
k_O	Concentração na qual ocorre a metade do consumo de oxigênio	mol/m ³
k_1, k_2 e k_3	Parâmetros cinéticos da equação que modula a proliferação em função da concentração de O ₂	
N	Número de células do tumor	
N_{max}	Capacidade máxima de carga do tumor permitida	
n	Densidade de células	cel/m ³
n_o	Densidade inicial de células	cel/m ³
m_o	Contribuição da concentração de oxigênio na proliferação celular	
O	Concentração de oxigênio	mol/m ³
p	Pressão	Pa
Pe	Número de Péclet	
pg	Fator que inclui o efeito Warburg	
q	Vazão	m ³ /s
R_i	Termo de reação que pode ser uma taxa de consumo ou produção	mol/cel/s
Re	Número de Reynolds	
s	Números adimensionais da similitude	
t	Tempo	s
T	Temperatura	°C
u	Velocidade do fluido	m/s
V_o	Máximo consumo de oxigênio	mol/cel/s
V	Função teste, função peso ou função ponderação	
$\Delta \equiv \nabla^2$	Operador Laplaciano	

ϵ	Porosidade	
κ	Permeabilidade	m^2
μ	Viscosidade dinâmica do fluido	$kg/(m \cdot s)$
π_i	Pi termos da similitude	
ρ	Densidade do fluido	kg/m^3
τ	Tortuosidade	
Ω	Domínio do problema	
Γ	Contorno do problema	
ω_G	Taxa de consumo de glicose pelas células tumorais.	$mol/cel/s$
ω_O	Taxa de consumo de oxigênio pelas células tumorais.	$mol/cel/s$
ω_H	Taxa de produção de H^+ pelas células tumorais.	$mol/cel/s$

SUMÁRIO

CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO.....	1
CAPÍTULO II - REVISÃO DA LITERATURA.....	5
2.1. Introdução.....	5
2.2. Microfluídica.....	6
2.2.1. Mecânica dos fluidos em dispositivos de microfluídica.....	9
2.2.2. Mecanismos de transporte em dispositivos de microfluídica.....	12
2.2.2.1. Meios Porosos.....	13
2.2.2.2. Escoamentos em meios porosos.....	15
2.2.2.3. Difusão.....	16
2.2.3. Dispositivos de microfluídica usados para geração de gradientes de concentração.....	17
2.2.3.1. Gradiente baseado em escoamento.....	19
2.2.3.2. Gradiente baseado em difusão.....	22
2.2.4. Microfluídica no estudo da biologia celular.....	24
2.2.5. Câncer.....	33
2.2.5.1. Metabolismo do câncer.....	38
2.2.3. Modelagem matemática do comportamento celular.....	41
CAPÍTULO III - MATERIAIS E MÉTODOS.....	47
3.1. Descrição do dispositivo de microfluídica.....	47
3.2. Modelo para avaliar o transporte de substâncias.....	48
3.2.1. Descrição do modelo.....	49
3.2.2. Condições usadas para a solução do modelo.....	50
3.2.3. Modelo matemático para estimar o campo de concentração de substâncias no interior do dispositivo de microfluídica via similitude.....	54
3.2.4. Malha do modelo bidimensional.....	56
3.3. Modelo para avaliar o comportamento celular.....	56
3.3.1. Condições usadas na simulação do problema.....	57
3.3.2. Malha do modelo tridimensional.....	59
3.3.3. Formulação Fraca usada para a solução.....	59
3.4. Solução dos modelos.....	61
CAPÍTULO IV - MODELOS MATEMÁTICOS.....	63
4.1. Modelo matemático para representar o transporte de substâncias.....	63
4.1.2. Modelagem de escoamento e de transporte de massa em meios porosos.....	64
4.1.2.1. Difusão em meios porosos.....	65
4.1.3. Modelo matemático para estimar o campo de concentração de substâncias no interior do dispositivo de microfluídica via similitude.....	67

4.2. Modelos matemáticos para avaliar o comportamento celular.....	81
4.2.1. Modelo matemático para evolução celular considerando a glicose.....	81
4.2.2. Modelo matemático considerando as espécies glicose, oxigênio e íons de hidrogênio e sua influência no comportamento celular.....	84
4.2.2.1. Difusividade celular.....	85
4.2.2.2. Função de Proliferação $F_p(n,G,O)$	86
4.2.2.3. Função de Morte $F_d(n,G,pH,Ap)$	87
4.2.2.3.1. Morte por falta de nutrientes - $F_d(n,G)$	88
4.2.2.3.2. Morte por acidez - $F_{dpH}(n,pH)$	88
4.2.2.3.3. Morte por apoptose - $F_{ap}(n)$	90
4.3. Modelo de transporte de substâncias químicas acoplado com o modelo matemático celular.....	90
4.3.1. Difusividade efetiva das substâncias na presença de células.....	92
CAPÍTULO V - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	97
5.1. Resultados obtidos usando o modelo sem célula.....	97
5.1.1. Efeito da vazão de entrada.....	98
5.1.2. Efeito da variação da porosidade do hidrogel.....	99
5.1.3. Efeito da variação da permeabilidade do hidrogel.....	100
5.1.4. Estudo comparativo entre o hidrogel de colágeno tipo I e fibrina.....	101
5.1.5. Equação preditiva para estimar o campo de concentração de substâncias no microchip.....	105
5.2. Discussão do modelo sem célula.....	108
5.2.1. Limitações do modelo.....	109
5.2.2. Parâmetros importantes.....	109
5.2.3. Estudo comparativo hidrogel de fibrina e colágeno.....	110
5.2.4. Modelo matemático via similitude.....	111
5.3. Comparação do modelo proposto com resultados experimentais.....	112
5.3.1. Comparação com modelo sem células.....	112
5.3.2. Comparação com modelo com células.....	115
5.4. Resultados obtidos usando o modelo com células.....	121
5.4.1. Caso 01 - Mudança de regime de renovação.....	121
5.4.2. Caso 02 - Variação da densidade inicial de células.....	129
5.4.3. Caso 03 - Mudança geométrica.....	134
5.4.4. Caso 04 - Variação do pg	139
5.4.5. Caso 05 - escoamento contínuo por 30 min.....	141
5.5. Considerações e Limitações dos modelos.....	143
CAPÍTULO VI - CONCLUSÃO.....	145
CAPÍTULO VII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	149

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

O câncer é uma das principais causas de morte no mundo, apesar da extensa pesquisa e dos esforços dos cientistas na descoberta de medicamentos para curar essas doenças (TSAI et al., 2017). Em parte, isso está relacionado aos elevados custos envolvidos no desenvolvimento de medicamentos; o entendimento dos mecanismos envolvidos nos primeiros estágios da metástase; funções da vascularização; heterogeneidade do tumor e influência do microambiente tumoral.

O microambiente tumoral (MT) é caracterizado por gradiente de nutrientes, oxigênio e resíduos produzidos pelas células. O MT tem um impacto relevante na biologia do câncer bem como na sua resposta a agentes quimioterapêuticos (AYUSO et al., 2016; MA; XU; QIN, 2013). O microambiente tumoral é composto por múltiplos tipos de células, uma variedade de fatores solúveis, matriz extracelular (MEC) e sinais mecânicos (MA; XU; QIN, 2013).

As limitações dos ensaios convencionais em controlar precisamente os estímulos bem como o microambiente celular, tem conduzido ao desenvolvimento de novas técnicas de ensaios usando tecnologia de microfabricação como os microchips e MEC 3D (POLACHEK; ZERVANTONAKIS; KAMM, 2012). Para mimetizar de forma relevante e entender a influência do microambiente tumoral, bem como promover avanços significativos na terapia contra o câncer, é necessário desenvolver abordagens mais efetivas. Recentemente, as pesquisas nesta área tem progredido por meio de tecnologias avançadas

como os micro dispositivos de microfluídica conhecidos como *organs-on-a-chip*; *lab-on-a-chip*; *body-on-a-chip* e *tumor-on-a-chip* (BOUSSOMMIER-CALLEJA et al., 2016; PORTILLO-LARA; ANNABI, 2016; TSAI et al., 2017).

Neste contexto, como alternativa aos modelos *in vivo* complexos, de custo elevado e envolvendo problemas éticos, os modelos *in vitro* de microfluídica são alternativas promissoras que tem sido amplamente usados para estudar vários fenômenos biológicos (MENON et al., 2015; MAHED e VAIDYA, 2017).

A microfluídica tem apresentado um impacto significativo sobre a miniaturização dos experimentos biológicos e apresenta diversas vantagens em relação às técnicas convencionais tais como: redução das amostra e reagentes; baixo custo; paralelização de experimentos; menor tempo de análises, uma vez que os processos de transferência de calor e massa são rápidos; monitoramento em tempo real; controle dos gradientes de concentração (CHOI et al., 2016; MAHESH; VAIDYA, 2017).

Os sistemas de microfluídica podem auxiliar no entendimento das interações entre células do câncer e do sistema imune, bem como a resistência à administração de fármacos. Somaweera; Ibragimov; Pappas (2016) destacam que os dispositivos de microfluídica, em particular aqueles que promovem o gradiente químico, têm sido amplamente empregados nos ensaios biológicos.

Nas últimas décadas, graças aos avanços na capacidade de processamento dos computadores, os modelos computacionais têm ganhado destaque no campo da biologia celular. Os modelos computacionais aliados aos modelos matemáticos têm contribuído para o entendimento do comportamento biológico das células e tecidos, sem as dificuldades de tempo e consumo de reagentes e outras substâncias inerentes às investigações experimentais.

Sendo assim, a possibilidade de modelar computacionalmente microchips destinados à análises biológicas representa um avanço no estudo do comportamento celular. Esses modelos podem auxiliar nos ajustes das investigações experimentais usando microfluídica, uma vez que permitem simular uma ampla variedade de experimentos biológicos contribuindo também para a redução dos custos associados aos experimentos. E, posteriormente, ajudar para o entendimento da influência dos estímulos externos sobre o comportamento biológico das células e tecidos.

Cabe destacar que há uma carência de trabalhos dedicados, ou seja, modelos matemático-computacionais de células cancerosas em microchips. Contudo, o interesse

pela comunidade científica em utilizar os *tumor-on-a-chip* contribui significativamente para o desenvolvimento desses modelos.

Diante disso, o objetivo deste trabalho é o desenvolvimento de modelos matemáticos computacionais que simulam aspectos do comportamento de células tumorais, como proliferação e morte, no interior de um dispositivo de microfluídica destinado a análises biológicas, em função das condições do microambiente. Com essa proposta, modelos de aproximação utilizando o método dos elementos finitos foram usados.

Para atingir o objetivo proposto, o trabalho foi desenvolvido de acordo com os seguintes capítulos.

- Capítulo I – Introdução ao problema e motivação para o desenvolvimento do trabalho, bem como apresentação dos objetivos a serem alcançados.
- Capítulo II – Revisão da literatura acerca dos sistemas de microfluídica, mecanismos de transportes nos dispositivos de microfluídica, aplicações na área biológica, metabolismo do câncer e modelos matemáticos relacionados às células tumorais.
- Capítulo III – Metodologia usada para o desenvolvimento dos modelos propostos neste trabalho. Neste capítulo é apresentada a descrição do problema abordado juntamente com os métodos de solução utilizados para a implementação dos modelos computacionais.
- Capítulo IV – Descrição dos modelos matemáticos usados para representar a distribuição de substâncias (glicose, oxigênio e íons de H^+) dentro de um dispositivo de microfluídica, bem como os modelos matemáticos propostos para simular o comportamento celular, ou seja, proliferação e morte, em função do gradiente de concentração dessas substâncias no interior do chip.
- Capítulo V – Análise e discussão dos resultados obtidos dos modelos propostos.
- Capítulo VI – Conclusões e sugestões para trabalhos futuros;
- Capítulo VII – Referências bibliográficas utilizadas no trabalho.

CAPÍTULO II

REVISÃO DA LITERATURA

Este capítulo apresenta uma revisão da literatura referente aos dispositivos de microfluídica utilizados em aplicações de processos biológicos básicos; modelos computacionais dos sistemas de microfluídica que abrangem a influência das variáveis físicas, químicas e biológicas sobre o comportamento celular; aplicações dos sistemas de microfluídica e modelos matemáticos relacionados ao câncer.

2.1. Introdução

O microambiente celular é heterogêneo e altamente complexo, constituído de diferentes tipos de células imersas em uma matriz extracelular (MEC), sujeitas a múltiplos sinais que variam no espaço e tempo (HE; LIN, 2017). Estes sinais incluem o gradiente de citocinas, proteínas secretadas por células vizinhas, temperatura, concentração de oxigênio, pH, interações mecânicas célula-célula e interações célula-MEC, tensões de cisalhamento devido o escoamento intersticial dentre outros (EL-ALI; SORGER; JENSEN, 2006).

Em particular, sinais químicos tais como fatores de crescimento, hormônios, quimiocinas, nutrientes e oxigênio existem dissolvidos ou unidos à MEC e tem uma distribuição espacial que varia no tempo. O gradiente de concentração dessas substâncias regula vários processos celulares (ABHYANKAR et al., 2006; CHUNG; CHOO, 2010) tais como o crescimento, proliferação e migração (BORAU; KAMM; GARCÍA-AZNAR, 2011), que

por sua vez, influenciam em vários processos fisiológicos e patológicos como a cicatrização de feridas, a inflamação (VELNAR; BAILEY; SMRKOLJ, 2009), a angiogênese (AMO et al., 2016) e o desenvolvimento e metástase do câncer (PORTILLO-LARA; ANNABI, 2016). Da mesma maneira, a distribuição destas substâncias é importante em tratamentos como a imunoterapia (BOUSSOMMIER-CALLEJA et al., 2016) e no resultado do uso de fármacos sobre diferentes tipos de células (KIM; KIM; JEON, 2010; SOMAWEERA; IBRAGUIMOV; PAPPAS, 2016). Na Figura 2.1 é ilustrado o microambiente celular exposto à variação dos diversos parâmetros citados.

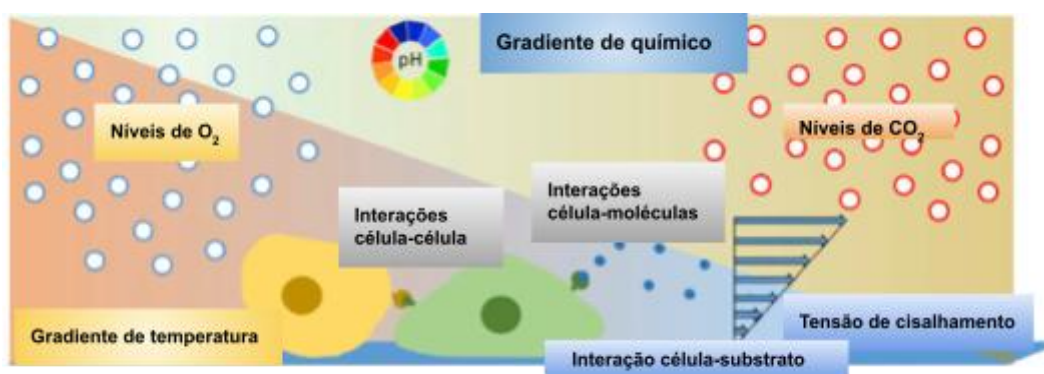


Figura 2.1 - Microambiente celular consiste de fatores físicos (tensões de cisalhamento) bioquímicos (interações célula-célula) e físico químico (pH, CO₂, temperatura, O₂) (Adaptado de COLUCCIO et al., 2019)

2.2. Microfluídica

O corpo humano é uma rede complexa de incontáveis moléculas, organelas, células e órgãos, bem como suas interações. As células são unidades básicas estruturais e funcionais dos organismos vivos. Entender a composição, estrutura e funções das células, bem como explorar suas atividades é importante para reconhecer os fenômenos que regem a vida. Nos organismos vivos as células estão localizadas em micro ambientes complexos sujeitos a múltiplos sinais que variam no espaço e tempo. O microambiente é significativamente importante para manter as funções celulares tais como migração, crescimento e proliferação (MA; XU; QIN, 2013).

As abordagens convencionais *in vitro*, usualmente empregadas em análises biológicas, são simplificadas e não proporcionam dados realísticos desta complexa rede de interações. Geralmente, os processos tradicionais de cultura celular consistem de um ambiente estático e, portanto, não permitem reproduzir respostas fisiológicas em função de

estímulos dinâmicos observados *in vivo*. Por outro lado, os estudos *in vivo* em animais fornecem dados muito complexos, com alta variabilidade de um indivíduo a outro, que podem ser ou não relevantes para humanos (BOUSSOMMIER-CALLEJA et al., 2016; KIM, et al., 2014). As limitações dos ensaios convencionais em controlar precisamente os estímulos, bem como o microambiente celular, tem conduzido ao desenvolvimento de novas técnicas de ensaio usando tecnologia de microfabricação como os microchips e MEC 3D (POLACHEK, W. J.; CHAREST; KAMM, 2011).

Avanços recentes têm oferecido oportunidades de superar as limitações e as metodologias dos ensaios tradicionais *in vitro*. Neste cenário, a microfluídica é uma tecnologia emergente em rápida expansão que apresenta-se como uma plataforma atrativa para uma variedade de aplicações, particularmente no campo da biologia e em áreas da saúde (KIM, et al., 2014; MA; XU; QIN, 2013; MAHESH; VAIDYA, 2017). Os dispositivos de microfluídica apresentam-se como uma ferramenta importante para análises biológicas, pois permitem mimetizar o microambiente das células, ou seja, criar um microambiente fisiologicamente relevante, e estudar suas funções bem como explorar suas atividades biológicas de interesse.

Como alternativa aos modelos *in vivo* complexos, de custo elevado e que envolvem problemas éticos, os modelos *in vitro* de microfluídica são alternativas promissoras para estudar vários fenômenos biológicos (MAHESH; VAIDYA, 2017; MENON et al., 2015). Os sistemas de microfluídica, conhecidos como *lab-on-chips*, *organ-on-a-chips* e *body-on-a-chip*, em particular aqueles que promovem o gradiente químico, têm sido empregados em ensaios biológicos (SOMAWEERA; IBRAGUIMOV; PAPPAS, 2016).

A microfluídica é um novo campo multidisciplinar emergente que lida com a manipulação de fluidos em micro e nanoescala (MAHESH; VAIDYA, 2017; SACKMANN; FULTON; BEEBE, 2014). A microfluídica é a ciência e tecnologia de sistemas que estudam e manipulam pequenas quantidades de fluidos, utilizando estruturas (microchips) que processam ou manipulam pequenas quantidades de fluidos em canais de dimensões de algumas dezenas ou centenas de micrômetros (TOH et al., 2018; WHITESIDES, 2006).

Os sistemas de microfluídica apresentam diversas vantagens em relação às técnicas de laboratórios convencionais tais como a habilidade de conduzir ensaios com pequenas quantidades de amostra e reagentes, baixo custo, paralelização de experimentos, rápido processamento das amostras, monitoramento em tempo real e miniaturização (CHOI et al., 2016; MAHESH; VAIDYA, 2017; MENON et al., 2015; NAGARAJU et al., 2018; SACKMANN; FULTON; BEEBE, 2014; WHITESIDES, 2006). Na Figura 2.2 é apresentado

um esquema comparativo dos diferentes tipos de modelos disponíveis para pesquisas experimentais na área da biologia celular.

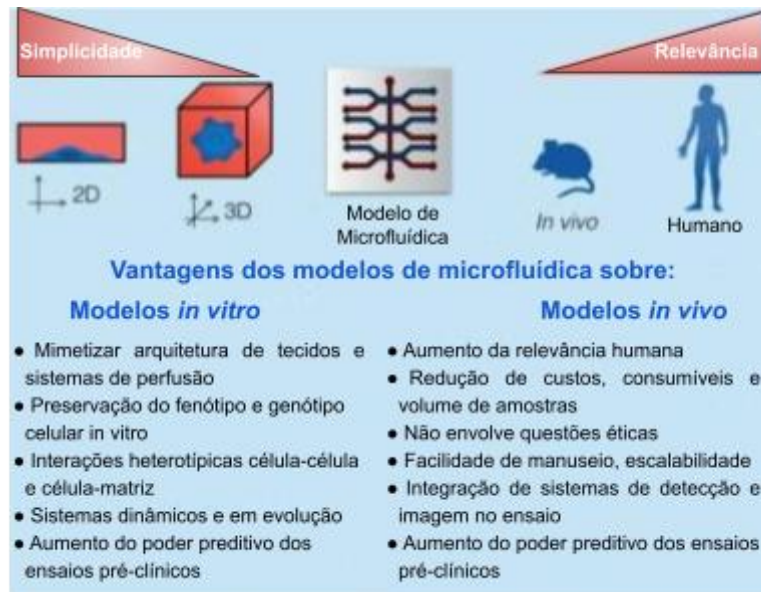


Figura 2.2 – Esquema comparativo das abordagens experimentais apresentado as vantagens dos modelos de microfluídica sobre os modelos convencionais *in vivo* e *in vitro* disponíveis para análises biológicas (Adaptado de PORTILLO-LARA; ANNABI, 2016)

Apesar de ter sua origem em outras áreas da ciência, a microfluídica tem sido usada em campos como a biologia, pois permite a manipulação precisa de estímulos físicos e químicos que atuam sobre as células, simulando um microambiente fisiologicamente relevante, seletivo e confiável (HE; LIN, 2017). Na Figura 2.3 é mostrado um exemplo de dispositivo de microfluídica utilizado em aplicações biológicas.

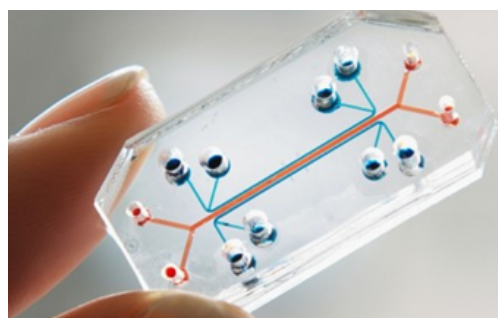


Figura 2.3 – Exemplo de um modelo de dispositivo de microfluídica utilizado em aplicações biológicas.

A microfluídica é uma tecnologia versátil que permite estudar condições dinâmicas, e isso tem despertado o interesse em todos os segmentos biotecnológicos (OLIVEIRA et al., 2016). O interesse da comunidade acadêmica por esses dispositivos têm crescido nos últimos anos, conforme destacado nas Fig.2.4a–b que exemplificam o aumento do número de publicações científicas envolvendo microfluídica (COLUCCIO et al., 2019; ZHANG; RADISIC, 2017).

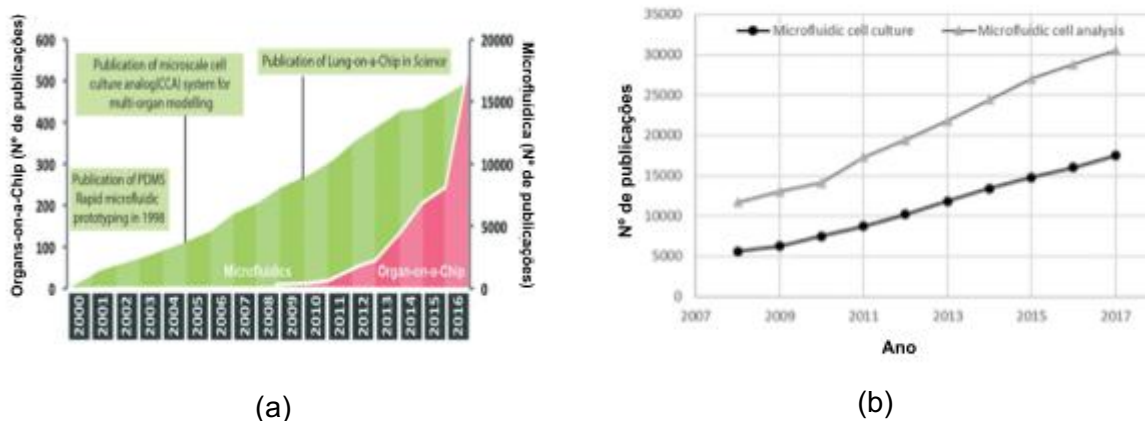


Figura 2.4 – (a) Publicação de trabalhos acadêmicos sobre microfluídica e *organ-on-a-chip*. (Adaptado de ZHANG; RADISIC, 2017). (b) Número de publicações acadêmicas relacionadas à análise celular por meio dos dispositivos microfluídicos (Adaptado de COLUCCIO et al., 2019).

2.2.1. Mecânica dos fluidos em dispositivos de microfluídica

A mecânica dos fluidos desempenha um papel crucial na manutenção da fisiologia celular além de mediar processos patológicos. Diversos processos fisiológicos dependem da presença de um escoamento de fluido extracelular para transportar, dentre outros, nutrientes e resíduos celulares. Além disso, os carregamentos mecânicos transmitidos pelo fluido na forma de pressão e cisalhamento podem funcionar como reguladores de sinalização celular (HE; LIN, 2017). Dado que a mecânica dos fluidos é essencial no entendimento de diversos aspectos da mecanobiologia celular, neste tópico serão descritos sucintamente alguns conceitos da mecânica dos fluidos bem como dos processos de transporte aplicados aos sistemas de microfluídica destinados à análises biológicas.

Um fluido pode ser definido como um material que se deforma continuamente sob tensão de cisalhamento, ou mais especificamente, com a aplicação de uma força externa que tenta deslocar parte dos elementos de fluido na camada limite (*i.e.*, na superfície). O

escoamento de fluidos nos dispositivos de microfluídica é governado pelas equações de Navier-Stokes (N–S) (Eq.2.1). As equações N–S assumem que o fluido usado é incompressível e Newtoniano. A suposição de incompressibilidade é feita quando os líquidos experimentam mudanças desprezíveis de volume em resposta à variação de pressão (WHITE, 2010). O fluido Newtoniano é aquele cuja viscosidade é constante para diferentes taxas de cisalhamento e não varia com o tempo. Várias aplicações de fluidos Newtonianos em sistemas de microfluídica têm sido reportadas na literatura, destacando-se como exemplos: corantes fluorescente a base de água; meio de cultura celular; soluções contendo fatores de crescimento, proteínas, nutrientes e fármacos diluídos entre outros (TOH et al., 2014).

As equações de Navier-Stokes descrevem como a velocidade, pressão e densidade de um fluido em movimento estão relacionadas e incluem os efeitos viscosos sobre o escoamento (HUANG et al., 2010). A influência da gravidade ou outras forças de campo são contabilizadas pelo termo F da Eq. (2.1) e, em alguns casos, podem ser negligenciadas em análises de escoamentos em sistemas com dimensões da ordem de micrometros, como no caso dos dispositivos de microfluídica. Assim, para o caso tridimensional, fluido Newtoniano, as equações de Navier-Stokes são dadas por:

$$\rho \frac{\partial u}{\partial t} + \rho u \cdot \nabla u = \mu \nabla^2 u - \nabla p + F \quad (2.1)$$

em que ρ representa a densidade do fluido (kg/m^3), u denota a velocidade do fluido (m/s), μ é a viscosidade dinâmica do fluido ($\text{kg}/(\text{m} \cdot \text{s})$), p a pressão (Pa) e F representa as forças externas aplicadas ao fluido, ∇^2 é o operador Laplaciano, algumas vezes denotado com o símbolo Δ .

O balanço de massa requer:

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

Dada a condição de incompressibilidade a Eq.(2.2) é reduzida a $\nabla \cdot u = 0$ para um escoamento com densidade constante (SQUIRES; QUAKE, 2005).

A microfluídica explora uma característica importante, o pequeno tamanho dos microcanais (WHITESIDES, 2006). Em função dessa característica, o escoamento em microescala é quase sempre laminar e, portanto, o número de Reynolds (Re) é baixo

(geralmente menor que 1) (MAHESH; VAIDYA, 2017; SACKMANN; FULTON; BEEBE, 2014). O número de Reynolds (Re) é usado para caracterizar o regime de determinado escoamento – laminar ou turbulento. O número de Reynolds é uma quantidade adimensional que descreve a relação das forças inerciais (ρU^2) e viscosas ($\frac{\mu U}{L}$) em um fluido e determina o limite entre o regime laminar e turbulento sendo dado pela Eq.(2.3).

$$Re = \frac{\rho U^2}{\left(\frac{\mu U}{L}\right)} = \frac{\rho U L}{\mu} \quad (2.3)$$

em que U denota a velocidade média do fluido, L o comprimento característico do canal. A velocidade média (U) pode ser calculada pela aplicação de um escoamento no canal dado por $Q = UA$, onde A representa a área da seção transversal do canal. O comprimento característico (L) também denominado de diâmetro hidráulico, é computado em função da geometria da seção transversal do canal (BEEBE; MENSING; WALKER, 2002).

Para escoamentos desenvolvidos em macro escala, o escoamento é normalmente governado por forças inerciais, conduzindo a um escoamento caótico conhecido como escoamento turbulento ($Re > 2\ 300$). Contudo, conforme Re diminui, as forças viscosas se tornam dominantes em detrimento às forças inerciais, conduzindo a um escoamento laminar (Fig. 2.5) (BEEBE; MENSING; WALKER, 2002; SQUIRES; QUAKE, 2005). O escoamento laminar é uma das características mais importantes que descreve a física dos fluidos em escala micrométrica comparado ao escoamento em macro escala (KIM; KIM; JEON, 2010; ONG et al., 2008).

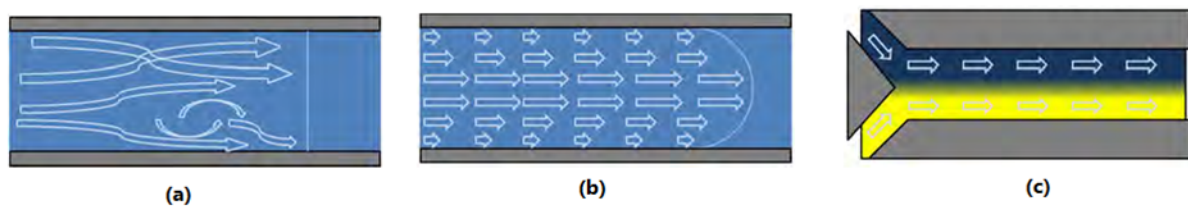


Figura 2.5 – (a) Esquema de um escoamento turbulento que é governado pelas forças inerciais, com elevado número de Re , gerando vórtices e instabilidade do fluido (b) escoamento laminar governado por forças viscosas, isto é, baixo número de Re , na qual o escoamento é previsível (c) esquema de dois escoamentos laminares paralelos desenvolvidos em micro canais de um dispositivo de microfluídica.

De acordo com a Eq.(2.3), baixo número de Re é alcançado em baixas velocidades, pequenas dimensões, baixas densidades ou elevadas viscosidades. Contudo, com relação a escoamentos em microcanais o escoamento laminar é devido principalmente às pequenas dimensões envolvidas. Pequenos comprimentos juntamente com baixos escoamentos resultam em Re menores que 100 e geralmente menores que 1 ($Re \ll 1$ são referidos, na literatura inglesa, como *creeping flow*) (ONG et al., 2008). Geralmente, os microcanais não tem seção transversal circular. Em dispositivos de microfluídica geradores de gradiente de concentração baseado em difusão o $Re \ll 1$ e as forças viscosas ($\mu \nabla^2 u$) são dominantes em detrimento das forças convectivas ($\rho u \cdot \nabla u$) e, portanto, o termo advectivo pode ser omitido da Eq.(2.1) sendo, denominada de equação de Stokes. Assim a equação de Stokes, considerando-se escoamento em regime transiente e regime permanente é descrita pelas Eq.(2.4) e Eq. (2.5) respectivamente.

$$\rho \frac{\partial u}{\partial t} = \mu \nabla^2 u - \nabla p \quad (2.4)$$

$$\nabla p = \mu \nabla^2 u \quad (2.5)$$

Neste contexto, o campo de velocidade do fluido nos dispositivos de microfluídica geradores de gradiente é determinado aplicando-se as considerações e simplificações apropriadas às equações N-S. Ademais, o escoamento de fluido no interior dos sistemas de microfluídica com canais de dimensões da ordem de micrômetros, conforme já destacado, é geralmente laminar. Uma consequência importante do escoamento laminar relativo à microfluídica é que permite um maior controle do processo de transporte de massa, isto é, de moléculas no seu interior sendo, portanto, adequado para mimetizar e explorar vários processos biológicos. Alterações na velocidade do escoamento de fluido, geometria dos dispositivos de microfluídica e gradiente de concentração podem ser usados para reproduzir e estudar os efeitos sobre o comportamento das células.

2.2.2. Mecanismos de transporte em dispositivos de microfluídica

Existem dois tipos de transporte em dispositivos de microfluídica: o transporte por advecção e o transporte por difusão (ONG et al., 2008). A principal diferença está na natureza do agente responsável pelo transporte. A advecção é controlada pela presença de um trabalho exercido sobre o fluido que resulta em um escoamento de fluido. Por outro

lado, a difusão ocorre quando existe o gradiente de concentração molecular no fluido. A difusão é um fenômeno que ocorre devido ao movimento aleatório de moléculas de uma região mais concentrada para uma menos concentrada, no sentido de igualar as concentrações.

Existe outro número adimensional empregado em microfluídica, o número de Péclet (Pe), que é utilizado para definir a dinâmica do processo de mistura, sendo definido pela razão entre o transporte convectivo (UC) e o transporte difusivo $\left(\frac{c}{L}\right)$, conforme descrito pela Eq.(2.6). Sob diferentes circunstâncias e para diferentes geometrias dos sistemas de microfluídica, um ou outro tipo de transporte será predominante ou mesmo ambos podem ter contribuições semelhantes

$$Pe = \frac{UC}{D\frac{c}{L}} = \frac{UL}{D} \quad (2.6)$$

em que (UC) corresponde ao transporte por advecção e $\left(\frac{c}{L}\right)$ o transporte por difusão. Conforme descrito na Eq.(2.6), quando o $Pe \gg 1$ o mecanismo de transporte de massa por convecção é predominante. Por outro lado, para $Pe \ll 1$ o mecanismo de transporte de massa predominante é a difusão (ONG et al., 2008; SOMAWEERA; IBRAGUIMOV; PAPPAS, 2016; SQUIRES; QUAKE, 2005; TOH. et al., 2014).

Para o caso de estudos biológicos utilizando dispositivos de microfluídica, o transporte de substâncias diluídas ocorre em meio poroso.

2.2.2.1. Meios Porosos

As células residem em microambientes altamente especializados denominados matriz extracelular (MEC) que oferecem suporte mecânico e transmitem sinais extracelulares importantes para as células (SWARTZ; FLEURY, 2007). A MEC é uma mistura complexa de macromoléculas e água que regula a motilidade celular, proliferação e apoptose por meio de sinais bioquímicos e biofísicos (YANG; MOTTE; KAUFMAN, 2010). Diversos sistemas biológicos, como a matriz extracelular, envolvem múltiplos componentes e podem ser modelados como meios porosos.

Um meio poroso é definido como uma matriz de material sólido consistindo de vazios interconectados. Particularmente, os meios porosos naturais como solos e tecidos

biológicos, constituem uma ampla classe de sistemas complexos (GHANBARIAN et al., 2013). Isso ocorre, dentre outros, devido à distribuição dos poros, tamanho e interconectividade entre os poros que é altamente caótico e variam em uma ampla faixa (GHANBARIAN et al., 2013). Esses materiais são caracterizados, principalmente, pela sua porosidade (ϵ), permeabilidade (κ) e tortuosidade (τ) (KHALED; VAFI, 2003). A porosidade é um parâmetro utilizado para quantificar os espaços vazios ou poros, ou seja, consiste na fração de vazios de um determinado material, é uma quantidade adimensional que é determinada pela razão do volume de poros pelo volume total do material. A permeabilidade (κ) é uma característica da matriz que relaciona a velocidade do fluido e o gradiente de pressão, e representa a facilidade de um fluido fluir no meio poroso. A permeabilidade depende de vários fatores, tais como o tamanho do poro, composição e geometria da matriz (SWARTZ; FLEURY, 2007).

Os tecidos biológicos podem ser tratados como meios porosos uma vez que são compostos de células dispersas em um ambiente separados por vazios interconectados que permitem que o escoamento de nutrientes, minerais, fatores de crescimento, dentre outros, alcancem todas as células do tecido (KHALED; VAFI, 2003). As diversas abordagens propostas para entender os fenômenos biológicos associados ao transporte de moléculas, escoamento intersticial, transporte de fármacos e etc., têm sido conduzidas considerando-se modelos porosos (GERMAN; MADHALLY, 2016; JAIN, 1987; NARASIMHAN, 2011; SWARTZ; FLEURY, 2007). Os hidrogéis têm sido bastante empregados como modelo para o estudo do transporte de moléculas solúveis e formação de gradientes químicos em sistemas biológicos devido sua similaridade com a matriz extracelular (MORENO-AROTZENA et al., 2015).

Os componentes específicos da matriz extracelular variam muito de acordo com o tipo de tecido, mas, geralmente, incluem a família dos colágenos, proteoglicanos e lamininas. A composição específica da MEC determina a resistência ao escoamento de fluido. Na Figura 2.6 é apresentado um esquema do espaço intersticial com os principais componentes da matriz extracelular, célula e um escoamento intersticial. Estima-se que cerca de 20 % da massa corpórea é constituída de fluido intersticial, e que a maior parte deste fluido está em constante movimento, embora lento (SWARTZ; FLEURY, 2007). As faixas de velocidades são desconhecidas, no entanto, algumas medidas sugerem velocidades da ordem de 0,1 – 2 $\mu\text{m/s}$ e que é aumentado, por exemplo, durante um processo inflamatório (SWARTZ; FLEURY, 2007).

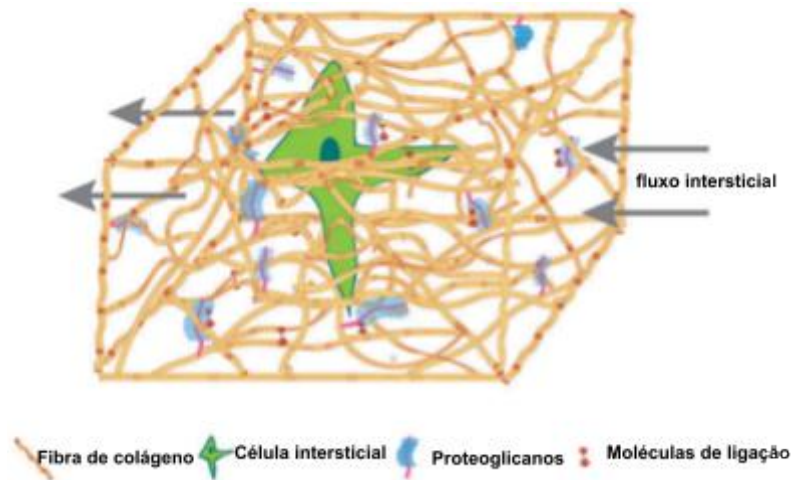


Figura 2.6 – Esquema do espaço intersticial ilustrando as principais características e componentes da matriz extracelular (Adaptado de SWARTZ; FLEURY, 2007).

2.2.2.2. Escoamentos em meios porosos

O transporte de massa dentro do interstício é crucial para a manutenção das células intersticiais. A distribuição espacial das substâncias diluídas nos dispositivos de microfluídica pode ser determinada pelo modelo de reação-advectação-difusão que estabelece um balanço entre o fluxo mássico difusivo $D_i \Delta C_i(r, t)$, fluxo mássico convectivo $u_i \cdot \nabla C_i(r, t)$ e a taxa de reação conforme apresentado pela Eq.(2.7)

$$\frac{\partial C_i(r, t)}{\partial t} + u_i \cdot \nabla C_i(r, t) = D_i \Delta C_i(r, t) + R_i \quad (2.7)$$

em que $C_i(r, t)$ é a concentração do soluto (mol/m^3); u_i é o vetor velocidade do soluto (m/s); D_i denota a difusividade (m^2/s) do soluto i ; Δ é o operador laplaciano; R_i representa o termo de reação que pode ser uma taxa de consumo ou produção ($\text{mol}/\text{m}^3/\text{s}$). Nos estudos conduzidos neste trabalho, o termo de reação representa a taxa de consumo de nutrientes (glicose) e O_2 e produção de H^+ pelas células cancerosas. Ademais, devido às baixas velocidades do escoamento intersticial, e pautando-se pelo número de Péclet, o termo convectivo pode ser desprezado (SWARTZ; FLEURY, 2007).

O escoamento no tecido artificial (*scaffold*) representado por um meio poroso é governado pela combinação da equação de continuidade e *momentum*, que juntas formam a equação de Brinkman, conforme apresentado pelas Eq.(2.8) e Eq.(2.9).

$$\frac{\partial(\rho \cdot \epsilon)}{\partial t} + \nabla \cdot (\rho, u) = Q_{br} \quad (2.8)$$

$$\frac{\rho}{\epsilon} \left(\frac{\partial u}{\partial t} + (u \cdot \nabla) \frac{u}{\epsilon} \right) = -\nabla p + \nabla \cdot \left[\frac{\mu}{\epsilon} \left\{ (\nabla u + (\nabla u)^T) - \frac{2}{3} (\nabla \cdot u) I \right\} \right] - \left(\frac{\mu}{\kappa} + \frac{Q_{br}}{\epsilon^2} \right) u + F \quad (2.9)$$

Nas Equações (2.8) e (2.9), μ representa a viscosidade dinâmica do fluido ($\text{kg}/(\text{m} \cdot \text{s})$), u a velocidade (m/s), ρ é a densidade do fluido (kg/m^3), p a pressão (Pa), ϵ a porosidade, κ a permeabilidade do meio poroso (m^2) e Q_{br} uma fonte ou sumidouro mássico ($\text{kg}/(\text{m}^3 \cdot \text{s})$). A influência da gravidade ou outras forças de campo podem ser contabilizadas pelo termo F ($\text{kg}/(\text{m}^2 \cdot \text{s}^2)$).

2.2.2.3. Difusão

A difusão é um dos principais mecanismos de transporte da glicose em meios biológicos. A distribuição e disponibilidade da glicose e de outros solutos relevantes devem ser compreendidos, pois são importantes para a formação, crescimento e manutenção dos tecidos. O coeficiente de difusão é calculado usando a formulação de Stokes-Einstein (EINSTEIN, 1905), conforme Eq.(2.10), que define a difusão de um elemento de raio r imerso em um fluido contínuo

$$D_{\infty} = \frac{k_B \cdot T}{6\pi\mu r} \quad (2.10)$$

em que k_B é a constante de Boltzmann com valor de $1,3807 \times 10^{-23}$ J/K, T corresponde a temperatura em K, μ denota a viscosidade dinâmica do fluido em ($\text{kg}/(\text{m} \cdot \text{s})$) e r o raio da molécula. O transporte de biomoléculas solúveis no interior de matrizes de hidrogel sintético depende não somente das propriedades do soluto mas também do meio poroso. Assim, considerando-se que as moléculas se difundem numa matriz porosa, a difusividade deve ser corrigida.

A difusividade efetiva em um meio poroso, denotado por D_{eff} , depende da estrutura dos poros do material e das fases envolvidas. A difusão efetiva é definida conforme o transporte da substância diluída ocorre em meio livre, meio poroso saturado ou parcialmente saturado. Considerando-se os modelos propostos neste trabalho, a difusão irá ocorrer em meio poroso saturado. Assim, a difusividade efetiva – neste caso, da glicose –

pode ser determinada pelo modelo de Millington e Quirk que correlaciona a porosidade e tortuosidade (MILLINGTON; QUIRK, 1961) pela Eq.(2.11)

$$D_{eff} = \frac{\epsilon}{\tau} D_{\infty} \quad (2.11)$$

em que D_{∞} denota o coeficiente de difusão (m^2/s) para uma espécie diluída em um meio livre, e τ corresponde ao fator tortuosidade (adimensional).

A tortuosidade é responsável pela redução da difusividade devido aos componentes sólidos que restringem o movimento browniano. A difusão depende não somente do raio molecular, mas também de outros fatores como a razão de vazios do meio poroso e a interconectividade dos poros, isto é, a porosidade e a tortuosidade. Canais tortuosos dificultam o movimento das moléculas, o que, por sua vez, dá resistência à transferência de massa e, portanto, essa resistência é incluída pelo fator de tortuosidade. Assim, para determinar a difusão nas matrizes de hidrogel e tumores, deve-se contabilizar a tortuosidade do espaço intersticial conforme ilustrado na Fig. 2.7.

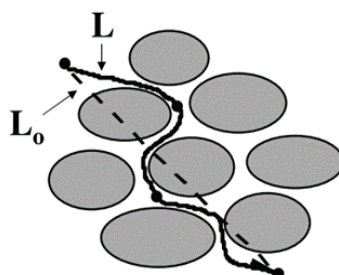


Figura 2.7 – Esquema do caminho percorrido por moléculas no espaço intersticial. A tortuosidade pode ser definida como a razão do caminho efetivo com o caminho linear (L/L_0) (Adaptado de RAMANUJAN et al., 2002).

2.2.3. Dispositivos de microfluídica usados para geração de gradientes de concentração

O microambiente celular é definido por parâmetros químicos e mecânicos (VELVE-CASQUILLAS et al., 2010). Uma das principais características dos sistemas de microfluídica é o controle do microambiente no nível celular. Além disso, a microfluídica permite a alteração desses parâmetros mecânicos e químicos dinamicamente e de forma rápida devido às características dos processos em microescala (TOH. et al., 2014).

As células estão sempre expostas ao gradiente de concentração de biomoléculas como fatores de crescimento, hormônios e quimiocinas que desempenha papel importante em uma ampla variedade de processos biológicos incluindo a resposta do sistema imune e o câncer (KEENAN; FOLCH, 2008). O entendimento dos fenômenos relacionados ao gradiente de concentração dessas biomoléculas requer a habilidade de expor as células em um microambiente controlável, quantificável e que mimetiza aquele presente *in vivo*.

Uma das primeiras e principais aplicações dos sistemas de microfluídica na biologia celular foi controlar o meio celular. Há um forte interesse por parte dos pesquisadores em produzir gradientes químicos para mimetizar os estímulos naturais que ocorrem em processos biológicos como migração celular, crescimento, diferenciação e apoptose (CHUNG; CHOO, 2010; KEENAN; FOLCH, 2008; VELVE-CASQUILLAS et al., 2010). Os dispositivos de microfluídica capazes de promover gradiente de concentração tem sido amplamente empregados em várias aplicações biológicas, uma vez que no corpo humano o gradiente de concentração de biomoléculas regula e controla diversas funções básicas das células (CHUNG; CHOO, 2010; KIM; KIM; JEON, 2010; TOH et al., 2014).

A manipulação do escoamento laminar de fluidos nos canais dos dispositivos de microfluídica torna possível criar gradientes de complexidade arbitrária de pequenas moléculas, fatores de crescimento e outras proteínas em solução (WEIBEL; WHITESIDES, 2006). Portanto, devido à habilidade de estabelecer e controlar os gradientes de concentração é possível mimetizar e controlar o microambiente celular em sistemas microfluídicos bem como estudar o comportamento das células (DHUMPA; ROPER, 2012).

Vários aspectos operacionais e de engenharia estão envolvidos no projeto de geradores de gradientes baseados em microfluídica. Diversas estratégias são reportadas na literatura com microchips capazes de promover o gradiente de concentração. Os sistemas de microfluídica geradores de gradiente podem produzir uma distribuição espacial e temporal de biomoléculas pelo controle dos processos de transportes difusivo e convectivo. Neste aspecto, podem ser categorizados, de forma geral, em dois grandes grupos de acordo com o princípio da formação do gradiente de concentração: gradiente baseado no escoamento (*flow-based or convection-based gradient generator*); gradiente baseado na difusão (*diffusion-based gradient generator*) (KIM, S.; KIM; JEON, 2010). Uma característica importante que distingue esses dois grupos é a presença do escoamento de fluido na região onde o gradiente de concentração é formado (TOH. et al., 2014).

2.2.3.1. Gradiente baseado em escoamento

Os dispositivos de microfluídica geradores de gradiente baseado em escoamento ($Pe > 1$) são frequentemente usados, por exemplo, para estudar a resposta de células que experimentam tensões de cisalhamento induzidos pelo escoamento em seus microambientes *in vivo*. Neste caso, a formação do gradiente de concentração se dá por meio da contribuição advectiva via escoamento laminar.

A formação do gradiente nestes sistemas ocorre a partir do contato de duas correntes de fluidos independentes e miscíveis que possuem diferentes concentrações de determinado soluto. Devido às características do escoamento laminar, predominantes nos sistemas de microfluídica, e da configuração dos microcanais que permitem a justaposição dos escoamentos de fluido, dá-se o processo de difusão molecular no sentido transversal ao escoamento e, portanto, um gradiente de concentração perpendicular à direção do escoamento. O escoamento laminar permite o controle direto da difusão entre os escoamentos paralelos, isto é, o controle da vazão ou velocidade do escoamento de fluido é um parâmetro importante que influencia diretamente no gradiente de concentração (KIM; KIM; JEON, 2010).

Métodos simples e efetivos para gerar um perfil difusivo entre dois escoamentos laminares, ou seja, gradiente baseado em escoamento, são os dispositivos de microfluídica que possuem canais em formato de Y ou T conforme apresentado no esquema da Fig. 2.8 (ATENCIA; COOKSEY; LOCASCIO, 2012; GARCÍA et al., 2015; KIM; KIM; JEON, 2010; TOH et al., 2014).

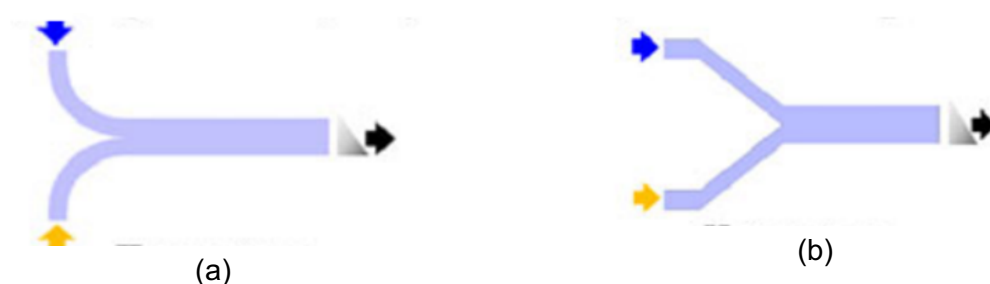


Figura 2.8 – Esquema de dispositivos de microfluídica geradores de gradiente de concentração baseados em escoamento. (a) microchip do tipo T (b) microchip do tipo Y (Adaptado de TOH et al., 2014)

Essa configuração simples dos canais desses dispositivos geradores de gradiente baseado em escoamento tem sido amplamente usados em experimentos biológicos que avaliam, por exemplo, a resposta dinâmica das células ao estímulo químico (TOH et al., 2014), ambientes circundantes aos tumores (WALSH et al. 2009), cicatrização de feridas (MEER et al. 2010), dentre outros. As vantagens e desvantagens dos dispositivos na forma de T ou Y vem da sua simplicidade. Embora o projeto desses dispositivos seja simples, a configuração da geometria desses dispositivos permite a geração de gradiente de concentração de perfis limitados como o perfil sigmóide.

Ismagilov et al. (2000) mostraram a eficiência dos dispositivos de microfluídica que possuem canais em formato de Y ou T na formação e controle do gradiente de concentração. Para tal fim, quantificaram teórica e experimentalmente a difusão de duas espécies moleculares de baixo peso molecular. Para isso, injetaram soluções de fluo-3 e CaCl_2 na entrada dos canais do dispositivo, conforme mostrado a Fig. 2.9, e assim pode-se avaliar o processo da mistura pelo complexo fluorescente formado entre os escoamentos. Eles observaram a influência da velocidade do escoamento por meio do tamanho da região de fluorescência, na qual o aumento da velocidade do fluido reduz a região de fluorescência e vice-versa. Essa descrição permite ajustar e planejar experimentos químicos e biológicos.

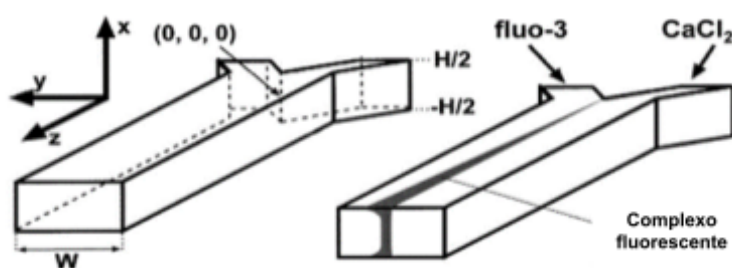


Figura 2.9 – Dispositivo de microfluídica usado para formar gradiente de concentração baseado em escoamento (Adaptado de ISMAGILOV et al., 2000).

Um dos projetos mais populares para microchips geradores de gradiente baseado em escoamento consiste de múltiplos canais que popularmente é reportado na literatura como árvore de natal (*Christmas tree*) desenvolvidos primeiramente por Jeon e colaboradores conforme mostrado na Fig. 2.10a (JEON et al., 2000).

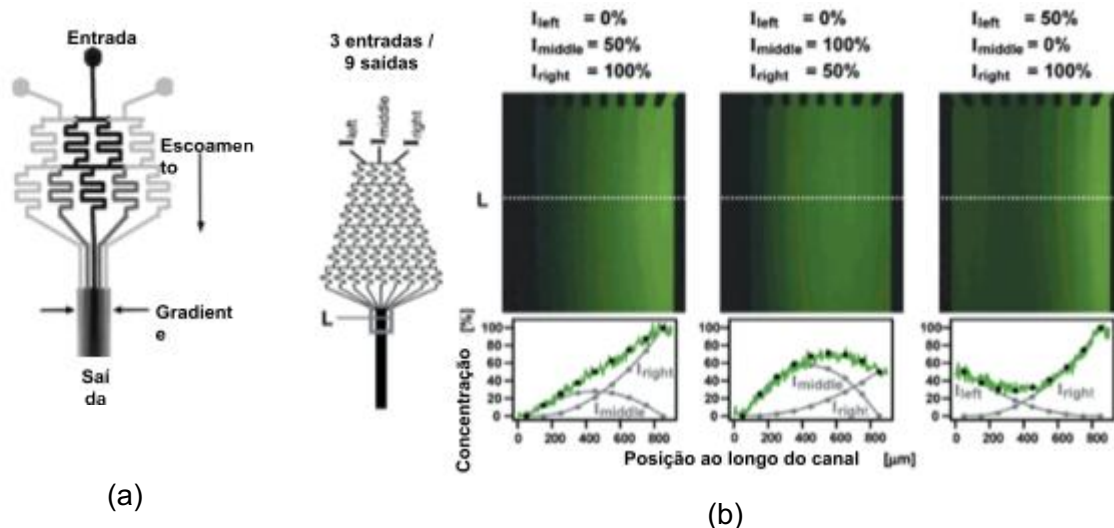


Figura 2.10 – (a) Esquema representativo de um dispositivo de microfluídica gerador de gradiente baseado no escoamento do tipo *Christmas Tree* contendo vários microcanais com diferentes concentrações químicas que se combinam para formar uma mistura específica na saída (Adaptado de JEON et al., 2000). (b) Gradiente de uma solução fluorescente linear e parabólica observado no microcanal da saída onde o escoamento foi de 1 mm/s (Adaptado de DERTINGER et al., 2001)

Dispositivos de microfluídica, conforme apresentados na Fig. 2.10, consistem de redes de microcanais que separam e recombina as correntes de escoamentos com diferentes concentrações de determinado soluto para formar um gradiente de concentração específico na saída. O perfil do gradiente de concentração na saída pode ser alterado pela concentração da substância na entrada, velocidade do escoamento e quantidade de microcanais. Na Figura 2.10b é mostrado diferentes perfis de concentração no canal de saída pela alteração das concentrações de entrada em cada microcanal para uma dada velocidade do escoamento.

A literatura reporta o uso dos geradores de gradiente do tipo *Christmas Tree* em diversas aplicações biológicas como o estudo que quantifica o efeito do escoamento na migração de células HL-60 durante a quimiotaxia (WALKER et al., 2005), o estudo do efeito do estímulo químico em células aderentes como MCF-7 (RUAN et al. 2009), células neurais (CHUNG et al. 2005), células do câncer de mama MDA-MB 231 (SAADI et al. 2006), neutrófilos (LIN et al. 2004) dentre outros.

2.2.3.2. Gradiente baseado em difusão

Os dispositivos de microfluídica geradores de gradiente baseados em difusão ($Pe < 1$) são comumente usados em estudos biológicos em que se deve evitar a exposição de tensões de cisalhamento nas células. A literatura reporta que células sujeitas a tensões de cisalhamento que não estão presentes em seus ambientes nativos *in vivo* respondem de forma diferente aos gradientes químicos, em comparação com as células nativas (KIM; KIM; JEON, 2010). Assim, os geradores de gradiente baseados em difusão são uma alternativa para o transporte das substâncias químicas (TOH et al., 2014).

Nestes dispositivos o gradiente se desenvolve por moléculas difundidas de uma fonte de alta concentração para uma de baixa concentração através de uma dada área contendo material poroso. Materiais porosos como, por exemplo, o hidrogel, usados nos sistemas microfluídicos permitem o gradiente de múltiplas espécies químicas e sinais biofísicos, mimetizando, assim, o microambiente *in vivo* de tipos de células específicas (KIM; KIM; JEON, 2010).

Abhyankar et al. (2006) desenvolveram um gerador de gradiente baseado em difusão que não requer um escoamento de fluido contínuo para estabelecer um gradiente químico estável. A ausência do escoamento de fluido torna este dispositivo adequado a aplicações de sinalização celular na qual os fatores solúveis podem impactar o comportamento celular. Esse dispositivo consiste de uma região fonte e um sumidouro conectados por um microcanal onde se desenvolve o gradiente de concentração, conforme mostrado na Fig. 2.11.

Para estabelecer e controlar o processo difusivo neste microcanal, Abhyankar et al. (2006) utilizaram uma membrana altamente resistente ao escoamento de fluido que é causada pela diferença de pressão no sistema, mas permite o transporte difusivo da espécie química para o canal. Uma vez que a membrana é resistente ao escoamento de fluido, o transporte convectivo é desprezível e, portanto, o gradiente químico foi estabelecido via difusão e, assim, as células não foram submetidas a tensões de cisalhamento. Essa abordagem foi adequada para analisar as respostas de células como neutrófilos. Neste trabalho Abhyankar e colaboradores apresentaram um exemplo de quimiotaxia – migração celular em resposta a um estímulo químico – dos neutrófilos, na qual demonstram que para o gradiente estabelecido no microcanal os neutrófilos migram em direção da fonte, onde a concentração molecular (*chemoattractant*) era maior (Fig. 2.11).

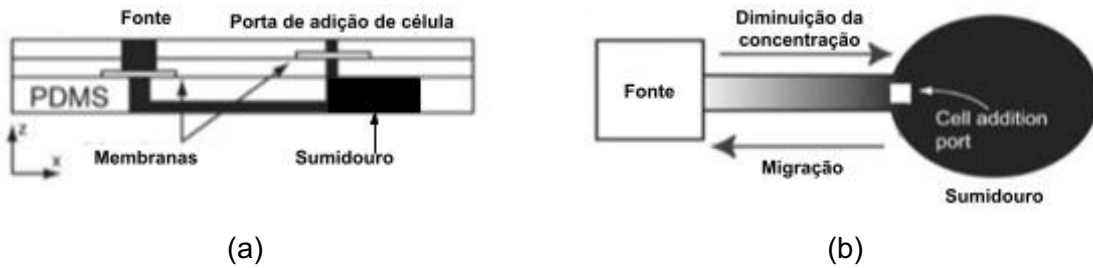


Figura 2.11 – Desenho esquemático do microdispositivo (a) da vista lateral (b) vista de topo destacando o gradiente de concentração e a direção de migração dos neutrófilos (Adaptado de ABHYANKAR et al., 2006)

Saadi et al. (2007) desenvolveram um dispositivo de microfluídica simples capaz de promover o gradiente de concentração em ambientes 2D e 3D. O dispositivo utiliza dois compartimentos para promover a difusão através de canais, preenchidos com hidrogel de colágeno, livres de escoamento conforme mostrada na Fig. 2.12. Para demonstrar a utilidade do sistema microfluídico, Saadi e colaboradores avaliaram a quimiotaxia do neutrófilo submetido ao gradiente do quimioatrativo IL-8.

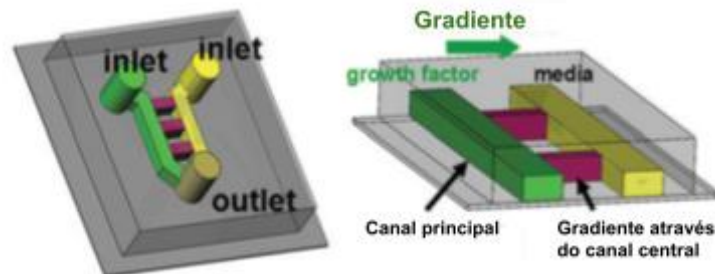


Figura 2.12 – Dispositivo de microfluídica gerador de gradiente baseado em difusão utilizado para avaliar a quimiotaxia de neutrófilos (Adaptado de SAADI et al., 2007)

Apesar dos projetos simples que envolvem os geradores de gradiente baseado em difusão apresentados anteriormente, outros dispositivos têm sido projetados visando promover o gradiente de múltiplas espécies químicas através de uma matriz porosa. Várias abordagens podem ser utilizadas para alcançar a distribuição espaço-temporal da espécie química de interesse. Contudo, a utilização da injeção do meio de cultura por meio de pipetas ou a promoção do gradiente de pressão por meio da diferença de altura entre duas colunas de fluido conectadas por um microcanal, tem sido procedimentos simples e de

baixo custo usados na prática experimental desses geradores de gradiente. Na Figura 2.13 é ilustrado o esquema desses dispositivos geradores de gradiente baseados em difusão através de um meio poroso de hidrogel.

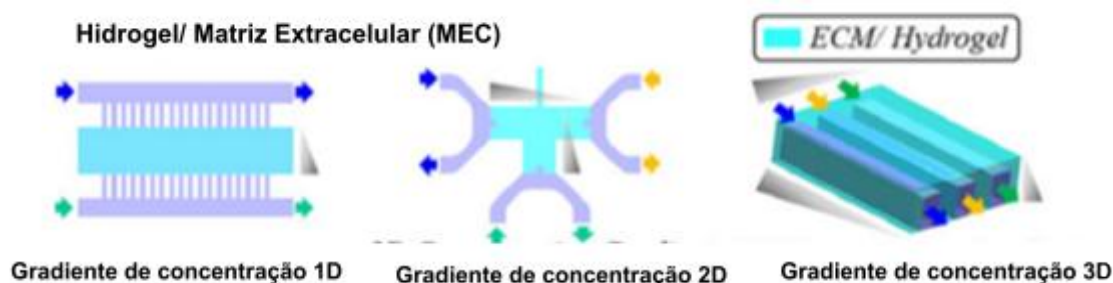


Figura 2.13 – Esquemas de sistemas geradores de gradiente baseados em difusão (Adaptado de TOH et al., 2014)

A microfluídica permite mimetizar o microambiente celular *in vivo*. Além disso, a geração de gradientes permite avaliar as células em diversas condições. Devido às vantagens descritas anteriormente, os sistemas de microfluídica tem se tornado uma ferramenta cada vez mais presente em diversas áreas de pesquisa biológica tais como cultura de células, classificação celular, câncer e metástase, células progenitoras, transporte de fármacos, diagnóstico clínico, engenharia de tecidos entre outros.

2.2.4. Microfluídica no estudo da biologia celular

Células tronco

Organismos complexos são formados por um conjunto de células individuais que cresceram e se diferenciaram. Todas as células do organismo são derivados de células precursoras denominadas células tronco. As células tronco são células indiferenciadas e não especializadas com as características de auto renovação ilimitada, ou seja, de gerar células iguais a si mesmas durante toda a vida e também diferentes tipos celulares com funções específicas. Essas células se dividem por meio de vias específicas para gerar células diferenciadas que realizam funções específicas em tecidos e órgãos (GUPTA et al., 2010).

O uso de células tronco na medicina é bastante promissor e várias aplicações de sucesso têm sido reportados na literatura (FERNANDES et al., 2009) com respeito à

utilização dessas células, tendo em vista suas potencialidades como na reconstrução de membros, órgãos e tecidos; tratamento de diversas doenças como câncer; doenças do coração; doenças hepáticas; Alzheimer; diabetes; doenças renais dentre outros.

As células tronco residem em um microambiente complexo que consiste da combinação de vários fatores incluindo sinais físicos (e.g., tensão de oxigênio, temperatura), bioquímico (e.g., fatores solúveis, sinalização parácrina), mecânico (e.g., rigidez do substrato, topografia, cisalhamento). A combinação desses fatores afetam o fenótipo celular, incluindo diferenciação, proliferação, migração e apoptose (Fig. 2.14).

As técnicas experimentais convencionais que envolvem células tronco não oferecem um ambiente fisiológico relevante, ou seja, não mimetizam adequadamente o microambiente dessas células. Isso ocorre, dentre outros, por falta de um controle preciso dos gradientes no espaço e tempo. Além disso, as abordagens convencionais possuem um custo elevado devido a quantidade de células e reagentes necessários, além de apresentarem baixa reprodutibilidade. Por outro lado, as plataformas de microfluídica (*Lab-on-a-chip*) podem mimetizar a complexidade de um tecido *in vivo* e oferecer um controle mais preciso de diferentes parâmetros. Essa capacidade é importante para o entendimento e aprimoramento das potenciais terapias baseadas em células tronco (GUPTA et al., 2010).

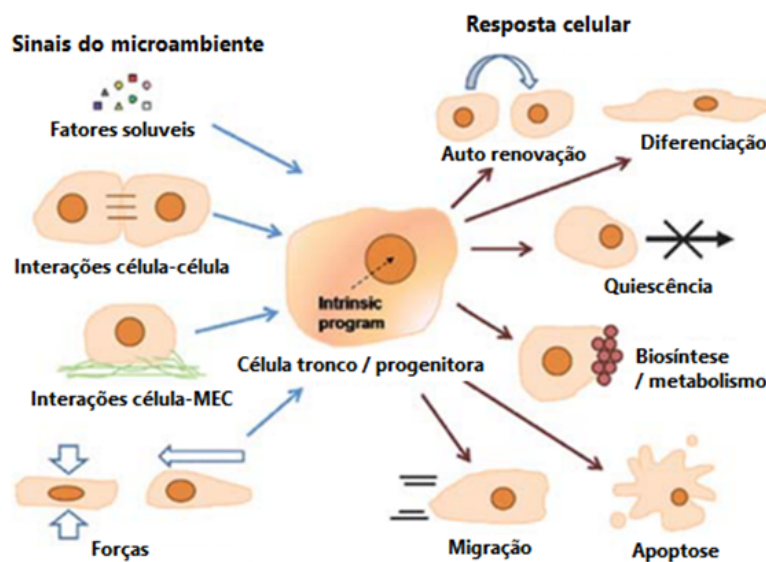


Figura 2.14 – Células tronco respondem a múltiplos sinais em um microambiente *in vivo*. Esquema ilustrando as várias interações entre os fatores solúveis, insolúveis e mecânicos que as células recebem em seu meio biológico que resultam na ativação de várias vias de transdução de sinal, levando a mudanças fenotípicas (Adaptado de GUPTA et al., 2010).

Abhyankar et al. (2003) demonstraram pela primeira vez com sucesso uma cultura de células embrionárias utilizando chips de microfluídica. Os autores destacam que a microfluídica é uma tecnologia promissora para cultura de células embrionárias devido principalmente a escala de comprimento envolvida, pois permitem que diferentes fatores (ex. fatores de crescimento) acumulem localmente formando um microambiente estável para a célula. Abhyankar et al. (2003) ainda destacam que no futuro, será possível controlar esse tipo de diferenciação para desenvolver órgãos artificiais, assim como reparar sistemas internos danificados.

As células tronco mesenquimais são consideradas uma fonte ideal de células para terapia e tratamento de várias doenças. Apesar do cenário promissor da utilização dessas células na engenharia de tecidos e medicina regenerativa, as células tronco mesenquimais são constituídas de subpopulações heterogêneas, isto é, com diferentes capacidades de auto renovação e propriedades multipotentes. Essas células são classificadas em três subpopulações distintas baseadas na suas características morfológicas. A classificação e separação dessas células, baseadas no seu tamanho, é importante para aumentar a efetividade das terapias. Nesse contexto, em pesquisa recente (JUNG; CHUN; CHANG, 2015) desenvolveram um projeto de microfluídica baseado no escoamento de fluido para separação dessas células (Fig. 2.15).

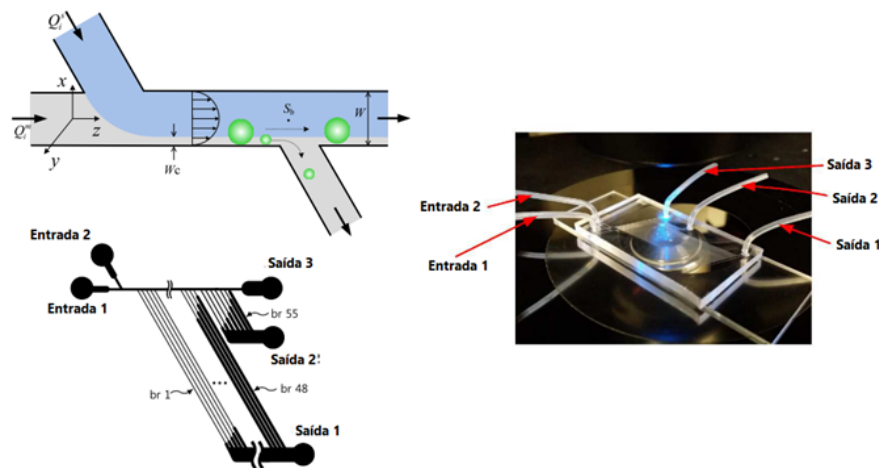


Figura 2.15 – Dispositivo de microfluídica usado no estudo de separação de células tronco mesenquimais. O desenho esquemático ilustra o escoamento de fluido nos micro canais e as várias saídas correspondentes a separação de células (Adaptado de JUNG; CHUN; CHANG, 2015)

Em pesquisa recente, a migração celular em um microambiente controlado foi utilizada para avaliar a influência da combinação das propriedades da MEC na migração celular de células tronco mesenquimais utilizando ensaios de microfluídica. Os ensaios foram conduzidos em chips de polidimetilsiloxano (PDMS) com valores diferentes de rugosidade, rigidez e hidrofobicidade, conforme mostrado na Fig. 2.16 (MENON et al., 2015).

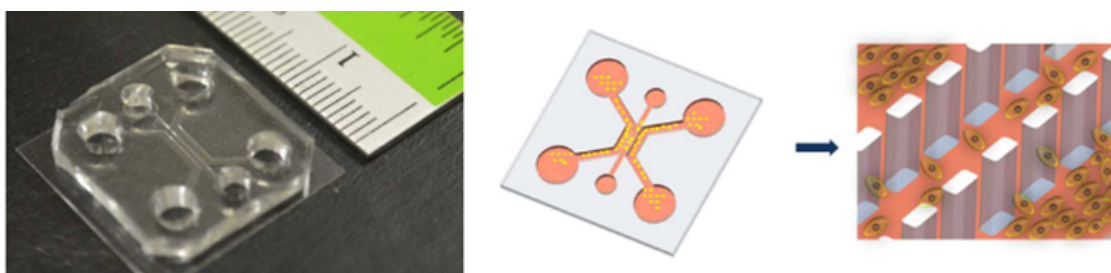


Figura 2.16 – Dispositivo de microfluídica usado no estudo da migração das células tronco mesenquimais com diferentes propriedades da MEC e esquema da migração das células para o micro canal central (Adaptado de MENON et al., 2015)

Angiogênese

A angiogênese é um processo de migração coletiva de células endoteliais com a finalidade de formar de novos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes. É um dos processos mais importantes durante a regeneração tecidual, pois fornece oxigênio e nutrientes para a região da lesão. Além disso, é um processo importante ligado ao desenvolvimento de diversas doenças, incluindo o câncer (AMO et al. 2016).

Uma das abordagens iniciais usando sistemas de microfluídica no estudo da angiogênese foi o trabalho realizado por Zervantonakis e colaboradores cujo objetivo foi entender a inter-relação entre as células do câncer com as células endoteliais (LEWIS; GERECHT, 2016). O sistema de microfluídica combinado com hidrogel usou um dispositivo tradicional projetado com dois canais laterais e um central central preenchido com hidrogel (Fig. 2.17).

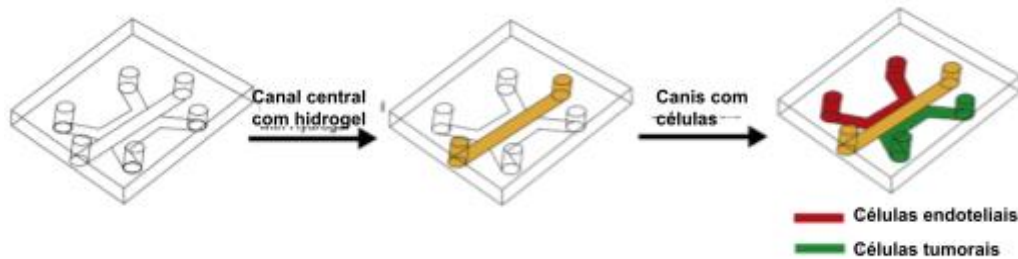


Figura 2.17 – Dispositivo de microfluídica empregado para o estudo da angiogênese contendo três canais sendo o canal central preenchido com hidrogel (laranja) enquanto os canais laterais foram preenchidos com células de câncer (verde) e células endoteliais (vermelho) (Adaptado de LEWIS; GERECHE, 2016)

Amo et al. (2016) estudaram a influência dos fatores de crescimento durante a angiogênese usando dispositivos de microfluídica (Fig 2.18). A utilização dos dispositivos de microfluídica é justificada, pois permitem reproduzir aspectos fundamentais da angiogênese e simular a cicatrização de feridas ou crescimento de tumor (AMO et al., 2016). Neste estudo, os autores observaram que a indução de gradientes do fator de crescimento do endotélio vascular VEGF aumenta o processo da angiogênese. O VEGF é considerado um dos fatores mais importantes pró-angiogênicos sendo produzido por macrófagos, linfócitos T, células tumorais, entre outros. Sua produção ocorre, principalmente, em condições de hipóxia. Assim, a angiogênese é regulada quando o tecido possui baixa concentração de oxigênio (hipóxia) ou inflamado, o que normalmente ocorre em feridas e microambientes tumorais (LEWIS; GERECHE, 2016). Por outro lado, os autores notaram que o fator TGF β inibiu o espalhamento e formação de novos vasos, e que esse fator pode, portanto, ser usado para suprimir o processo de formação de novos vasos nos tumores.

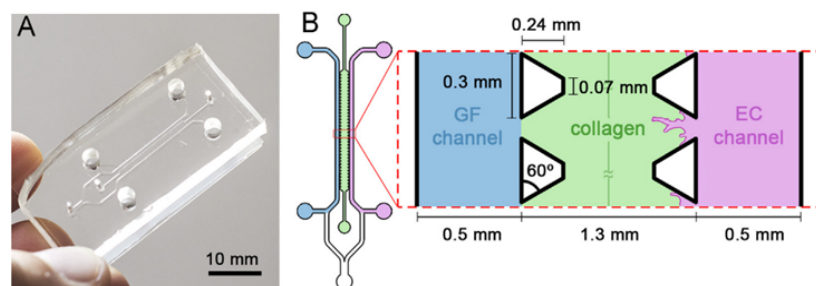


Figura 2.18 – (A) Dispositivo de microfluídica utilizado para estudar fatores de crescimento durante a angiogênese (B) vista superior do dispositivo sendo a câmara central (verde) preenchida com hidrogel e os canais laterais (rosa e azul) preenchidos com fatores de crescimento e células endoteliais respectivamente (Adaptado de AMO et al., 2016).

Neurologia

A neurologia é outro campo importante que está sendo explorado pela tecnologia da microfluídica. Os sistemas de microfluídica podem ser utilizados em ambos os casos, *in vivo* mediante a administração de fármacos situados sobre implantes neurais bem como em estudos *in vitro* de células neuronais (GROSS et al., 2007).

Entender os sinais que guiam o desenvolvimento neuronal e a formação de axônios, dendritos e sinapses ainda é um desafio fundamental da neurociência. Estudar como os sinais locais moldam os neurônios em desenvolvimento tem sido um desafio devido às limitações das técnicas tradicionais em mimetizar o complexo microambiente das células neuronais, na qual diferentes subdomínios possuem características químicas, física e fluídica distintas (MILLET; GILLETTE, 2012). A tecnologia de microfluídica tem sido amplamente empregada em uma variedade de aplicações de estudos do sistema nervoso devido sua capacidade de recriar microambientes com subdomínios neurais controlados (GROSS et al., 2007; MILLET; GILLETTE, 2012).

organs-on-a-chip / órgão em um chip

Sistemas que mimetizam e replicam as principais unidades funcionais básicas dos órgãos por meio da microfluídica com a finalidade de reconstituir a fisiopatologia em nível do órgão *in vitro*, são denominados de órgão em um chip, do inglês *organs-on-a-chip* (HUH et al., 2013). *Organs-on-a-chip* são as novas propostas de pesquisas utilizando plataforma de microfluídica, na qual esses dispositivos de microfluídica são usados para cultivar células vivas em micro câmaras contendo um suprimento contínuo de nutrientes que mimetiza as funções fisiológicas dos tecidos e órgãos. O objetivo dos *organs-on-a-chip* é reconstituir as funcionalidades de um órgão humano tridimensional sobre sistemas de microfluídica, permitindo, dessa forma, o controle preciso sobre os estímulos e características físicas, químicas e biológicas do órgão em estudo (BHATIA; INGBER, 2014; KIM et al., 2014).

Esses sistemas são utilizados para estudar respostas de órgãos específicos, diferentes estímulos químicos (fármacos, toxinas ou outros agentes químicos) e estímulos físicos (níveis fisiologicamente relevantes de cisalhamento devido ao escoamento de fluido, ciclos de deformação e compressão mecânica) (HUH; HAMILTON; INGBER, 2011).

Estes dispositivos têm um grande potencial para investigar mecanismos fisiológicos básicos dos órgãos bem como doenças. Vários pesquisadores fabricaram chips para

estudar fígado, rins, intestino, pulmão, coração, pele, vasos sanguíneos, dentre outros (BHATIA; INGBER, 2014; ESCH; BAHINSKI; HUH, 2015; HUH et al., 2013; KIM et al., 2014). A seguir, serão descritos sucintamente apenas algumas aplicações de *organs-on-a-chip* para efeito de ilustração das suas potencialidades.

Lung-on-a-Chip / Pulmão em um chip

Uma das pesquisas pioneiras com *organs-on-a-chip* foram com microssistemas que mimetizam o pulmão (*lung-on-a-chip*). Um exemplo de um pulmão em um chip consiste em um dispositivo de microfluídica para modelar a interface alvéolo-capilar, simulando uma unidade fundamental do pulmão humano, pela união de dois microcanais separados por uma fina membrana porosa flexível de PDMS. A disposição dos canais neste projeto permite o ar fluir no compartimento superior, sendo a membrana revestida com células epiteliais, e um meio de circulação no compartimento inferior, na qual a membrana é revestida de células endoteliais (Fig. 2.19). A aplicação de vácuo, nos canais laterais, durante a cultura de células facilita o crescimento das camadas celulares em ambos os lados da interface ar líquido enquanto simula o movimento de respiração (BHATIA; INGBER, 2014; HUH et al., 2013; HUH; HAMILTON; INGBER, 2011).

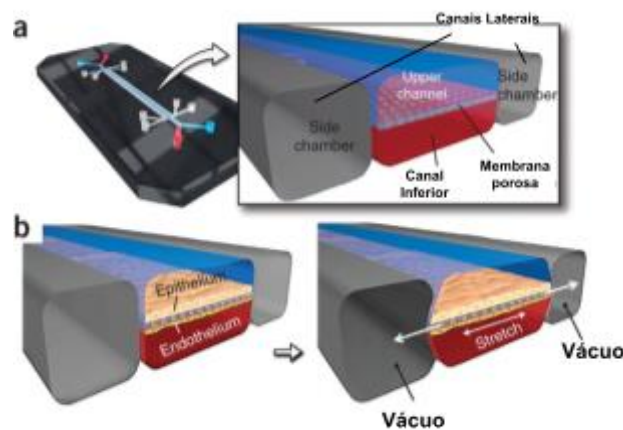


Figura 2.19 – Desenho esquemático de um *lung-on-a-chip* (a) canal central constituído de dois compartimentos separados por uma membrana flexível revestido com células (b) o movimento de respiração é reproduzido pela aplicação de vácuo nos canais laterais que causam o alongamento lateral da membrana flexível (Adaptado de HUH et al., 2013).

Gut-on-a-chip / Intestino em um chip

Pesquisadores desenvolveram um modelo *in vitro* baseado em células vivas de um intestino que mimetiza as propriedades patofisiológicas, mecânicas, estruturais, absorptivas e de transporte (KIM et al., 2012). Neste trabalho, os autores destacam a potencialidade de substituir testes em animais para estudar, dentre outros, o transporte e absorção de fármacos. O dispositivo é constituído de dois canais separados por uma membrana flexível revestida de MEC e células epiteliais do intestino humano (Caco-2) que mimetizam a complexa estrutura fisiológica do intestino (Fig. 2.20).

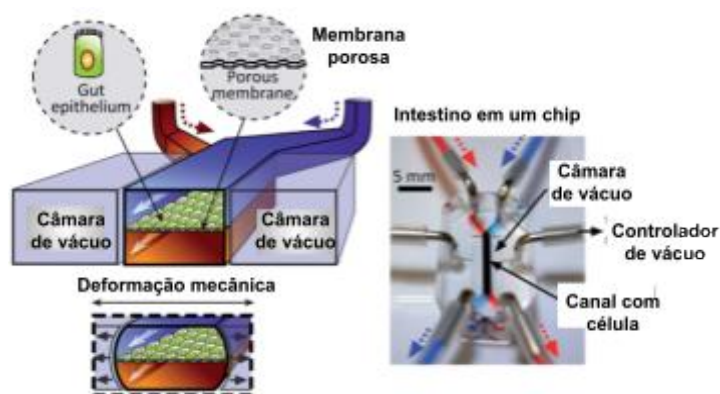


Figura 2.20 – Figura esquemática de um intestino em um chip (*gut-on-a-chip*) ilustrando a membrana flexível revestida de MEC e células do intestino e a deformação mecânica devido ao vácuo nos canais laterais (Adaptado de KIM et al., 2012)

Liver-on-a-chip / Fígado em um chip

O fígado é um órgão vital na manutenção da homeostasia e possui uma variedade de funções biológicas. Por isso, a construção de um dispositivo de microfluídica baseado nas principais funcionalidades desse órgão é essencial para diversas áreas como, por exemplo, o desenvolvimento farmacêutico e engenharia de tecidos (NAKAO et al., 2011). A Hepatotoxicidade é reconhecida como um dos principais problemas causados no fígado devido a efeitos colaterais de certos medicamentos (KIM et al., 2014). Nesse sentido, pesquisadores têm dedicado esforços para desenvolver sistemas de microfluídica para estudar as funcionalidades do fígado (LEE; HUNG; LEE, 2007), denominados, na literatura inglesa de *liver-on-a-chip*. Nakao *et al.* (2011) e Lee; Hung; Lee (2007) desenvolveram um dispositivo de microfluídica mimetizando um cordão hepático (Fig. 2.21).

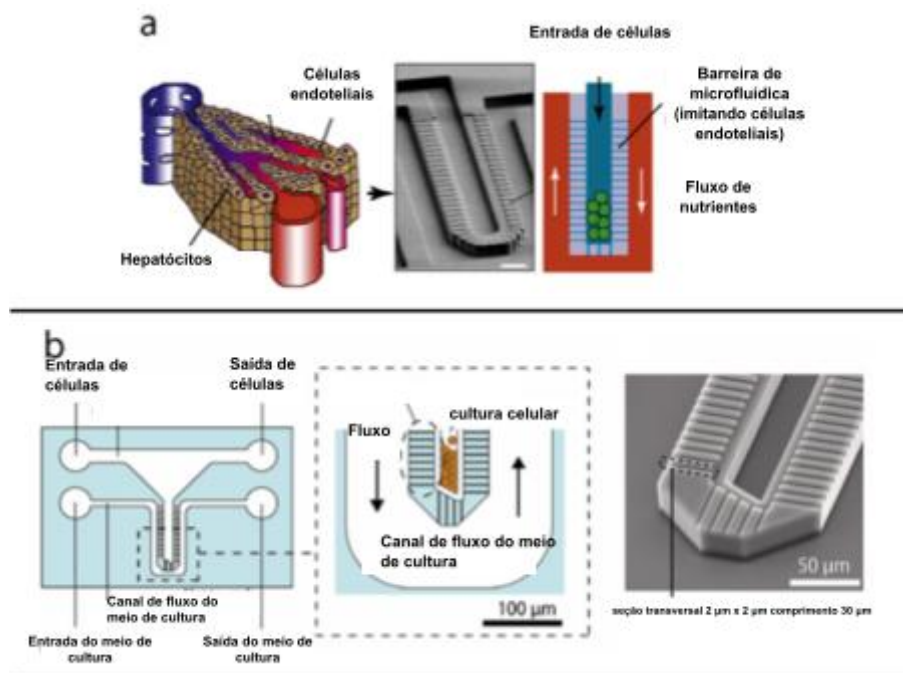


Figura 2.21 – Dispositivo de microfluídica mimetizando a estrutura de um cordão hepático. A unidade funcional desses microsistemas consiste de uma cultura de células hepáticas em uma câmara separada de um canal de nutrientes por uma barreira altamente permeável. Dispositivo desenvolvido por (a) Lee e colaboradores e (b) Nakao e colaboradores. (Adaptado de LEE; HUNG; LEE, 2007 e NAKAO et al., 2011).

Human-on-a-chip / Corpo em um chip

Sistemas de microfluídica representados pela associação de diferentes *organs-on-a-chip*, tais como intestino, pulmão, entre outros, são denominados de corpo em um chip, do inglês *human-on-a-chip*. Essa abordagem permite explorar, por exemplo, as diferentes rotas de um fármaco, bem como os seus efeitos de toxicidade em diferentes órgãos (HUH; HAMILTON; INGBER, 2011). Na Figura 2.22 é ilustrado um esquema de *human-on-a-chip* cuja finalidade consiste em avaliar o efeito de fármacos em diferentes órgãos.

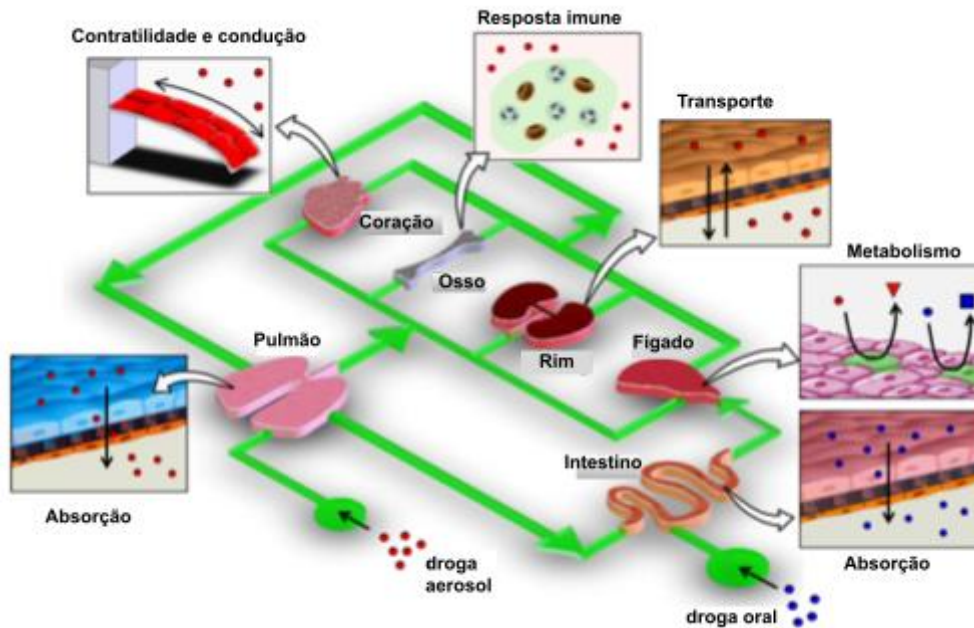


Figura 2.22 – Sistema de microfluídica representado diferentes órgãos integrados por um sistema circulatório relevante fisiologicamente para modelar o complexo processo de absorção, distribuição e metabolismo bem como a eficácia e toxicidade de fármacos (Adaptado de HUH; HAMILTON; INGBER, 2011).

2.2.5. Câncer

O câncer refere-se a um grupo de mais de 100 doenças que são caracterizadas pelo crescimento desordenado e espalhamento (metástase) de células anormais (INCA, 2017; LAMBERT; PATTABIRAMAN; WEINBERG, 2016). O câncer é uma das principais causas de morte no mundo, apesar da extensa pesquisa e dos esforços dos cientistas na descoberta de medicamentos para curar essas doenças (TSAI et al., 2017). Em parte, isso está relacionado aos elevados custos envolvidos no desenvolvimento de medicamentos; o entendimento dos mecanismos envolvidos nos primeiros estágios da metástase; funções da vascularização; heterogeneidade do tumor e influência do microambiente tumoral. Para alcançar avanços significativos na terapia contra o câncer, é necessário desenvolver abordagens mais efetivas para, por exemplo, monitorar o transporte de fármacos e entender a influência microambiente tumoral. Recentemente, as pesquisas nesta área tem avançado por meio de tecnologias avançadas como os micro dispositivos de microfluídica incluindo os *organs-on-a-chip* (BOUSSOMMIER-CALLEJA et al., 2016; PORTILLO-LARA; ANNABI, 2016; TSAI et al., 2017).

O desenvolvimento de um tumor é um processo altamente complexo envolvendo uma infinidade de interações, como escapar da resposta imune do hospedeiro, degradação da matriz extracelular e angiogênese (GERLEE; ANDERSON, 2008). Os tumores sólidos apresentam duas fases distintas de crescimento: a fase avascular e a fase vascular. Durante o estágio de crescimento avascular, o tamanho do tumor sólido ou esferóide é restringido em grande parte pela oferta de nutrientes limitada à difusão e, portanto, o tumor permanece localizado e tem um crescimento limitado (LOLAS; CHAPLAIN, 2006).

Apesar dos avanços no entendimento da biologia celular e molecular do câncer, a ocorrência da metástase é responsável por mais de 90 % das mortes relacionadas com o câncer (CABALLERO et al., 2017; LAMBERT; PATTABIRAMAN; WEINBERG, 2016; PORTILLO-LARA; ANNABI, 2016). Nesse sentido, vários modelos experimentais têm sido empregados no estudo dos mecanismos envolvidos no processo metastático. Compreender os mecanismos celulares na carcinogênese é crucial para o tratamento do câncer. Assim, para entender a formação, progressão e espalhamento do câncer é necessário abordar o problema em um contexto mais próximo da realidade, isto é, desenvolver um microambiente mais próximo daquele encontrado *in vivo*. No entanto, os modelos convencionais *in vitro* não são capazes de mimetizar a complexidade do microambiente tumoral encontrado *in vivo* (MA; XU; QIN, 2013; AYUSO et al., 2016; TSAI et al., 2017).

Os modelos de estudo *in vivo* com o uso de animais possuem um elevado custo e, frequentemente falham em prever a eficácia de medicamentos (fármacos) em humanos além de fornecer resultados complexos com elevada variabilidade que podem ou não ter relevância fisiológica para humanos (BOUSSOMMIER-CALLEJA et al., 2016; TSAI et al., 2017). Por outro lado, os modelos tradicionais de cultura de célula têm sido usados para monitorar a ação de fármacos, estudar a sinalização celular, proliferação, migração entre outros e, geralmente, esses modelos *in vitro* podem ser compostos de múltiplos tipos de células imersas em matrizes de hidrogel. Apesar do menor custo, comparativamente aos modelos *in vivo*, e a fácil manipulação, esses modelos não mimetizam o microambiente tumoral (TSAI et al., 2017).

O microambiente tumoral é um sistema altamente complexo consistindo de células não cancerosas, fatores solúveis, sinalização molecular, matriz extracelular, e sinais químicos e mecânicos (Fig. 2.23). O microambiente tumoral é um componente crucial na biologia do câncer sendo reconhecido como um significativo regulador da iniciação, progressão e metástase do câncer, além da resistência aos fármacos (AYUSO et al., 2016). Modelar as condições do microambiente tumoral *in vitro* com essa complexidade é tecnicamente um desafio. No entanto, os avanços recentes na tecnologia de microfluídica

tem oferecido oportunidades de mimetizar um microambiente fisiologicamente relevante encontrado por células tumorais *in vivo* (MA; XU; QIN, 2013).

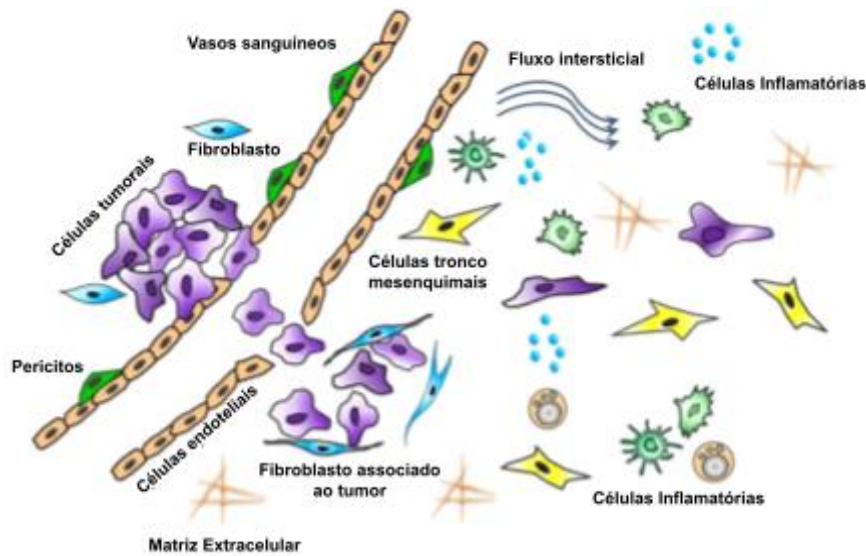


Figura 2.23 – Esquema do microambiente tumoral consistindo de células cancerosas e células não cancerosas, fatores solúveis, sinalização molecular, matriz extracelular, células de defesa, sinais mecânicos entre outros (Adaptado de MA; XU; QIN, 2013).

Como alternativa aos modelos *in vivo* com animais, os modelos de microfluídica denominados de *organs-on-a-chip*, especificamente neste caso os modelos de *tumor-on-a-chip*, emergiram recentemente como uma ferramenta promissora para o estudo do câncer (CABALLERO et al., 2017; SONTHEIMER-PHELPS; HASSELL; INGBER, 2019; TSAI et al., 2017). Esses modelos permitem aos experimentalistas variar parâmetros celular, molecular, químico e físico localmente de forma controlada, ambos individualmente e combinações desses parâmetros, enquanto avaliam a contribuição na formação, progressão e respostas a terapias do câncer (SONTHEIMER-PHELPS; HASSELL; INGBER, 2019). Essa tecnologia multidisciplinar integra microfluídica, microfabricação, engenharia de tecidos e pesquisas com biomateriais e tem o potencial de contribuir para o entendimento da biologia do câncer acelerando o desenvolvimento de medicamentos mais eficazes (TSAI et al., 2017).

Um *tumor-on-a-chip* consiste de um sistema de microfluídica que tem uma cultura de tecido e funções de suprimento de nutrientes e oxigênio e, remoção de resíduos (Fig. 2.24). Idealmente, um tumor tridimensional pode-se desenvolver em um chip com uma estrutura complexa de células tumorais, vasos sanguíneos e um microambiente com gradiente

químico controlado. Geralmente, esses dispositivos são compostos de uma região na qual é inserida o tecido artificial, composto pelas células tumorais, e microcanais responsáveis pelo suprimento de nutrientes e oxigênio, bem como a remoção dos resíduos. Esses microcanais exercem o papel dos vasos sanguíneos.

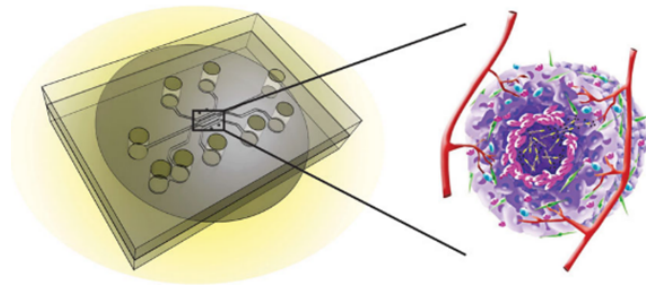


Figura 2.24 – Esquema de *tumor-on-a-chip*, um chip que pode conter cultura de tecidos, suprimento de nutrientes e oxigênio e remoção de resíduos (Adaptado de TSAI et al., 2017)

Como exemplo da primeira geração de sistemas de microfluídica destinada a estudar tumores, Tsai et al. (2017) destacam o trabalho de Aref e colaboradores, que utilizaram um dispositivo de microfluídica feito de PDMS, na qual esferóides de câncer de pulmão foram incorporados em matrizes tridimensionais adjacente a microcanais revestido com células endoteliais conforme mostrada na Fig. 2.25. Neste trabalho os autores exploraram o potencial de testar a eficácia de fármacos por meio de uma abordagem 3D em um micro dispositivo de microfluídica durante a progressão do câncer.

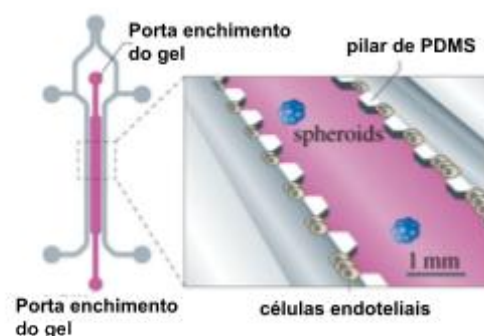


Figura 2.25 – Dispositivo de microfluídica para o estudo de esferóides de câncer de pulmão imersos em uma matriz tridimensional (Adaptado de ESCH; BAHINSKI; HUH, 2015).

Choi et al. (2015) descreveram a geração dos primeiros estágios do câncer de mama usando um modelo de microchip, além da avaliação da eficácia e toxicidade de um medicamento antineoplásico. Os autores reconstruíram uma estrutura 3D de tumores de mama baseado em células humanas. Especificamente, o sistema permitiu a co-cultura de esferóides de tumor de mama com células epiteliais dos ductos mamárias humanas e fibroblastos mamários para replicar a microarquitetura do carcinoma mamário *in situ* (CDIS) (Fig. 2.26). Este modelo representou um primeiro passo para recapitular a complexidade fisiopatológica do câncer de mama por meio de uma abordagem *in vitro* usando tecnologia de microfluídica. Isto pode ser usado como uma ferramenta para examinar sistematicamente a contribuição do microambiente do câncer de mama para a progressão do CDIS para uma forma invasiva da doença.

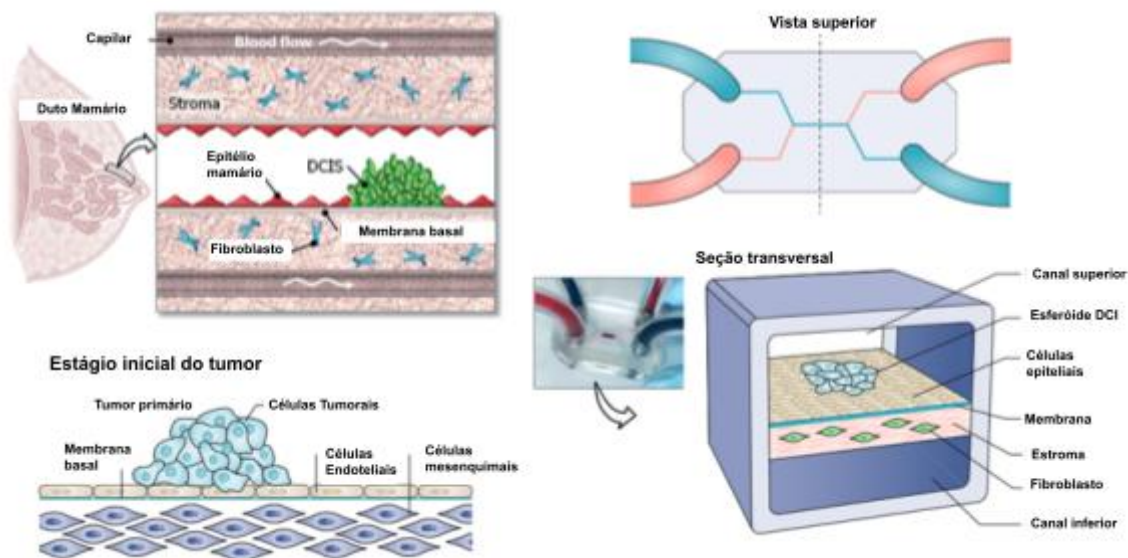


Figura 2.26 – Esquema de um câncer de mama em um micro dispositivo de microfluídica. O microchip consiste de um dois canais com cultura de células separadas por uma membrana que mimetiza a membrana basal *in vivo*. Esferóides de DCIS imersos no epitélio mamário no canal superior (Adaptado de CHOI et al., 2015)

Avanços recentes nas imunoterapias do câncer despertaram interesse no desenvolvimento de modelos *in vitro* de alto rendimento para simular as interações entre o sistema imunológico e o câncer. As terapias convencionais têm uma taxa de sucesso limitada em conter a metástase, o qual é responsável por mais de 90 % das mortes relacionadas ao câncer conforme destacado anteriormente. O uso da imunoterapia tem mostrado resultados promissores em reduzir a metástase em alguns tipos de câncer.

Neste contexto, a microfluídica se destaca como uma tecnologia promissora para estudos relacionados à imunoterapia contra o câncer (BOUSSOMMIER-CALLEJA et al., 2016; SUN et al., 2019). No entanto, a investigação de imunoterapias contra o câncer usando sistemas *organ-on-a-chip* ainda está em seus estágios iniciais. Os esforços de integração no câncer em um chip e no sistema imunológico em um chip podem auxiliar as investigações de imunoterapia do câncer *in vitro*, como a penetração do tumor pelas células do sistema imunológico, e levar à próxima geração de remédios eficazes contra o câncer.

Os modelos de microfluídica podem contribuir na caracterização das interações entre as células do sistema imune e células do câncer, além da análise da eficácia de novas imunoterapias. Neste contexto, a microfluídica representa um passo importante entre as pesquisas *in vitro* e estudos *in vivo* em animais e humanos (BOUSSOMMIER-CALLEJA et al., 2016).

2.2.5.1. Metabolismo do câncer

Todo organismo vivo gasta energia continuamente para manter as atividades celulares, nas quais moléculas são modificadas, ou seja, quebradas ou unidas entre si, transformando-se em outras. Esse conjunto de reações, isto é, de transformações que as substâncias químicas sofrem no interior dos organismos vivos constitui o metabolismo e, mais especificamente, utiliza-se a expressão metabolismo celular para referenciar o conjunto de reações que ocorrem nas células.

Essas reações metabólicas são classificadas em dois tipos fundamentais: reações de síntese e reações de degradação. Essas reações são responsáveis pelo crescimento e proliferação dentre outras atividades essenciais para manutenção da vida celular. As reações de síntese são aquelas em que moléculas mais simples são unidas para formar moléculas de maior complexidade. O conjunto de reações de síntese constitui o anabolismo. Em contrapartida, nas reações de degradação, moléculas complexas são quebradas em subunidades menores, transformando-se em moléculas mais simples com liberação de energia. As reações de degradação de moléculas constituem o catabolismo e é por meio de reações catabólicas que as células obtêm matéria prima e energia necessárias para desempenhar suas funções.

Para a manutenção da viabilidade celular é importante o balanço entre reações anabólicas e catabólicas. A principal fonte de energia para que as reações ocorram é o trifosfato de adenosina ou adenosina trifosfato (ATP).

O metabolismo celular é realizado por meio de vias diferentes, é altamente regulado, e é adaptável a uma ampla gama de condições e de sinalização celular. Os mecanismos envolvidos são complexos, mesmo quando se considera um único caminho, como a respiração aeróbica de glicose e oxigênio, e, portanto, muitas suposições simplificadoras devem ser feitas para construir um modelo tratável (ROBERTSON-TESSI et al., 2015).

As duas entradas metabólicas primárias para uma célula são os nutrientes glicose e oxigênio. As células metabolizam esses nutrientes para produzir ATP, a principal moeda energética dentro de uma célula. Existem dois mecanismos principais para a produção de ATP a partir da glicose dentro da célula. O primeiro é o caminho glicolítico, que converte glicose em piruvato. Este processo produz duas moléculas de ATP por molécula de glicose. A glicólise ocorre no citoplasma da célula e é um processo anaeróbico, por isso não requer oxigênio. O segundo mecanismo, que ocorre nas mitocôndrias, é a via respiratória aeróbica. Este processo utiliza o piruvato produzido a partir da glicólise para produzir até 36 moléculas adicionais de ATP e requer oxigênio (ROBERTSON-TESSI et al., 2015)..

Sob condições fisiológicas normais, uma célula não proliferativa com disponibilidade ilimitada de nutrientes usará glicólise para metabolizar parte da glicose disponível no piruvato, e então usar este piruvato para alimentar o caminho aeróbico para produção adicional de ATP. Este caminho é a rota mais eficiente para atender às demandas energéticas de longo prazo da célula (HEIDEN; CANTLEY; THOMPSON, 2009; ROBERTSON-TESSI et al., 2015).

Se o oxigênio se tornar escasso, a célula aumenta temporariamente o escoamento através da via glicolítica para compensar a diminuição da produção de ATP a partir da via aeróbica. Este reequilíbrio do fluxo, conhecido como efeito Pasteur, é menos eficiente do que a via aeróbica usada sob condições normóxicas, na medida em que mais moléculas de glicose são necessárias para criar a mesma quantidade de ATP (SHAMSI et al., 2018). No entanto, quando o oxigênio está ausente, é o único caminho viável para a produção de energia.

Se a glicose estiver esgotada, então a célula pode reduzir sua necessidade de ATP tornando-se quiescente e deve usar fontes alternativas de energia como ácidos graxos. Portanto, à medida que os níveis de glicose diminuem, as células se tornam primeiro quiescentes, e depois morrem por necrose se uma demanda mínima de ATP não for atendida pelos nutrientes disponíveis. A glicose é necessária tanto para vias anaeróbicas quanto aeróbicas, sendo, portanto, o nutriente limitante no processo de obtenção de energia (HEIDEN; CANTLEY; THOMPSON, 2009).

Uma consequência da via glicolítica é o aumento do fluxo de glicose e secreção de ácido no microambiente, pois o piruvato é convertido em ácido láctico, que pode ser bombeado para o espaço extracelular. Assim, por exemplo, em períodos prolongados de hipóxia, essa via causa uma acidificação do meio extracelular, que pode ter um efeito prejudicial sobre a sobrevivência celular.

A carcinogênese é um processo complexo e envolve diversas etapas que requer, dentre outros, a eliminação de barreiras antiproliferativas e mecanismos programados de indução de morte celular. O metabolismo celular é um dos principais processos afetados durante a transição das células normais em células cancerosas (ANNIBALDI; WIDMANN, 2010)

O metabolismo da glicose é frequentemente alterado em células tumorais para suportar sua rápida proliferação e expansão pelo corpo. As células tumorais são conhecidas por suas taxas de absorção de glicose aumentadas, mesmo na presença de oxigênio abundante. A regulação da taxa de absorção de glicose e sua fermentação em vias anaeróbicas, mesmo sob condições normóxicas, é uma observação prevalente em células cancerosas, ou seja, ao invés de alimentar a glicose na via da fosforilação oxidativa, geralmente usam glicose para glicólise aeróbica (Fig. 2.27). Esta mudança metabólica alterada para glicólise aeróbica é conhecida como o efeito Warburg, propriedade também compartilhada pelas células proliferativas normais, conforme apresenta a Fig. 2.27 (ANNIBALDI; WIDMANN, 2010)

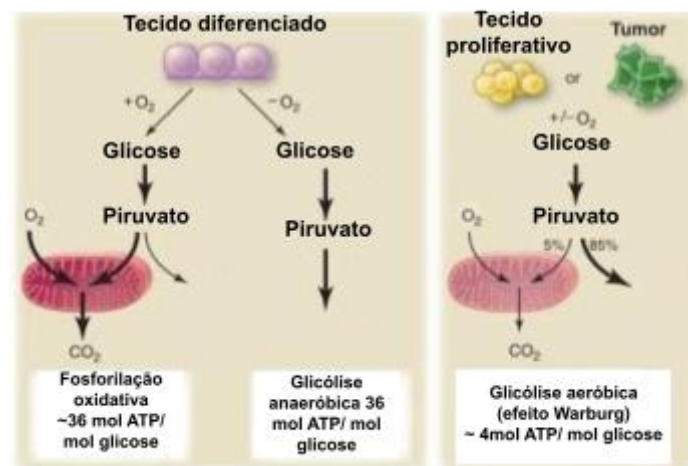


Figura 2.27 - Representação esquemática da fosforilação oxidativa, glicólise anaeróbica e glicólise aeróbica (efeito Warburg) (Adaptado de HEIDEN; CANTLEY; THOMPSON, 2009).

Com o metabolismo alterado, as células tumorais apresentam um consumo excessivo de glicose e maior produção de ácido H^+ (GATENBY; GAWLINSKI, 1996; ROBERTSON-TESSI et al., 2015; SHAMSI et al., 2018), portanto, a glicólise aeróbica induz a acidificação do ambiente tumoral, favorecendo o desenvolvimento de um fenótipo mais agressivo e invasivo. A aquisição de um fenótipo glicolítico confere uma vantagem de crescimento seletivo para as células cancerígenas (ANNIBALDI; WIDMANN, 2010).

Um aspecto chave apoiado por dados clínicos mostram que tumores *in situ* usam aproximadamente uma ordem de magnitude a mais de glicose que o tecido normal, e que o pH intersticial tumoral é menor que o pH do tecido normal (GATENBY; GAWLINSKI, 1996; PATEL et al., 2001). Essa alteração do pH observada na interface tumor-hospedeiro é prejudicial ao tecido normal, porque a viabilidade das células normais diminui acentuadamente para pH extracelular abaixo de 7,0 (CASCIARI, JOSEPH; SOTIRCHOS; SUTHERLAND, 1992; PATEL et al., 2001). Células normais tendem a entrar em apoptose quando expostas ao pH abaixo de 7,0 (CASCIARI; SOTIRCHOS; SUTHERLAND, 1992), ao passo que as células cancerígenas têm sua capacidade de proliferação ideal para pH em torno de 6,6 (GERLEE; ANDERSON, 2008). Além disso, um microambiente ácido estimula a produção de enzimas que degradam a matriz extracelular e, conseqüentemente, permitem que as células tumorais – células mais resistentes aos efeitos do pH extracelular ácido – invadam o tecido hospedeiro (PATEL et al., 2001).

Apesar do aumento do número de estudos conduzidos para entender as causas e conseqüências desse fenômeno, pouco se sabe sobre como o efeito Warburg afeta o crescimento e progressão tumoral (SHAMSI et al. 2018). Contudo, a literatura reporta evidências de vantagens adaptativas dessa mudança metabólica: rápida obtenção de energia; geração de biomassa; proteção contra danos oxidativos; favorecimento de invasão e metástase e evasão do sistema imune; aumento de captação de glicose pelas células tumorais.

2.2.3. Modelagem matemática do comportamento celular

A modelagem matemática é uma ferramenta poderosa para testar hipóteses, validar experimentos e simular a dinâmica de sistemas complexos. Além de ajudar a entender os fundamentos dos sistemas dinâmicos, os modelos matemáticos simulam sistemas complexos em um tempo relativamente curto sem os elevados custos associados aos experimentos de laboratório, bem como as correspondentes variações biológicas. A

modelagem computacional desempenha cada vez mais um papel importante na ciência biológica, pois as simulações podem ajudar os pesquisadores a determinar rapidamente as condições operacionais e, assim, reduzir o número de experimentos necessários (HU; QUARANTA; LI, 2007). Nesse sentido, o interesse da comunidade científica pela modelagem matemática do câncer está crescendo de forma exponencial, conforme pode ser evidenciado pela Fig. 2.28 (BRADY; ENDERLING, 2019).

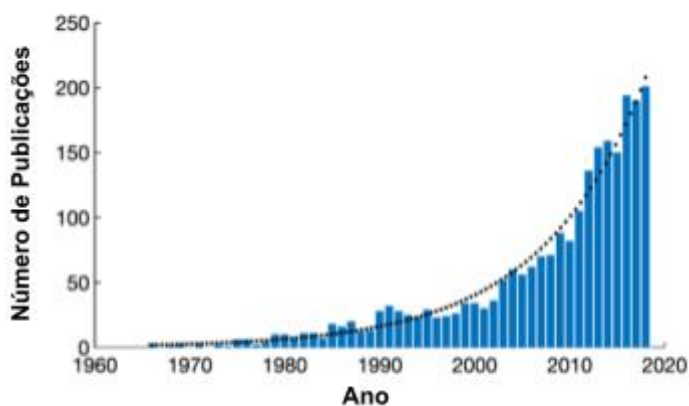


Figura 2.28 – Número de publicações acadêmicas relacionadas aos modelos matemáticos do câncer (Adaptado de BRADY; ENDERLING, 2019).

Em concomitante com o desenvolvimento da biologia do câncer, pesquisadores têm buscado implementar modelos e técnicas matemáticas para prever o desenvolvimento do câncer bem como resposta às terapias. Modelos preditivos e biologicamente relevantes do comportamento de tumores podem contribuir para testar sistematicamente diferentes terapias oncológicas de forma mais rápida e com menor custo. Neste contexto, a disponibilidade de um modelo matemático que possa prever a evolução temporal e espacial do crescimento tumoral permitiria aos oncologistas intervir de forma ideal para o paciente individual.

A capacidade de proliferar a taxas elevadas, e em microambientes muitas vezes escassos de nutrientes e tóxicos, muito além da capacidade das células normais, é a principal característica distintiva das células cancerosas. Neste contexto, a modelagem dos diversos aspectos do câncer é um desafio para os pesquisadores.

Uma abordagem para a modelagem matemática do tumor é empregar modelos "contínuos" que tratam as quantidades de um sistema, como, por exemplo, população de células tumorais e/ou concentrações de nutrientes como campos contínuos. As duas

principais formas de modelos contínuos são equações diferenciais ordinárias (EDO) e parciais (EDP) (JARRETT et al., 2018)

As primeiras tentativas de modelagem do crescimento tumoral utilizaram dados de cultura celular para encontrar expressão analítica que pudesse descrever matematicamente as mudanças observadas na população celular ao longo do tempo. Assim, os primeiros modelos empregados para o estudo do crescimento tumoral utilizaram modelos de crescimento exponencial, que pode ser representado por uma equação diferencial ordinária da forma:

$$\frac{dN}{dt} = k_g N(t) \quad (2.12)$$

em que $N(t)$ representa o número de células do tumor no tempo t , k_g é a taxa de crescimento das células tumorais. A Eq.(2.12) é uma equação diferencial ordinária, pois existe somente uma variável independente, neste caso t , que representa o tempo. Quando resolvida, a Eq.(2.12) resulta no modelo de crescimento exponencial $N = N_0 e^{k_g t}$, onde N_0 representa o número inicial de células. Neste caso, k_g pode ser entendido como sendo a diferença da taxa de proliferação (k_p) e taxa de morte (k_d), ou seja, $k_g = k_p - k_d$. Dessa forma, a dinâmica do crescimento tumoral pode seguir um dos três seguintes caminhos:

i. Se $k_p = k_d$, então $\frac{dN}{dt} = 0$

Neste caso, o número de células na população não muda e a população apresenta um estado de dormência tumoral. Neste caso, se $k_p = k_d = 0$ significa que todas as células da população estão em estado de dormência celular ou quiescência. Caso $k_p = k_d > 0$ a proliferação celular é equilibrada com a morte

ii. Se $k_p > k_d$, então $\frac{dN}{dt} > 0$

Neste caso, a população irá aumentar continuamente com uma taxa igual a diferença entre k_p e k_d .

iii. Se $k_p < k_d$, então $\frac{dN}{dt} < 0$

Neste caso, a população irá decrescer continuamente.

Os tumores sólidos inicialmente crescem rapidamente, contudo, o crescimento desacelera à medida que eles crescem. Portanto, a taxa per capita de crescimento do tumor deve depender do tamanho do tumor (N) e não permanecer constante. Esses modelos podem ser escritos de forma geral como

$$\frac{dN}{dt} = k_g(N) \cdot N \quad (2.13)$$

Um exemplo de uma taxa per capita de crescimento tumoral dependente do tamanho do tumor é dado pelo modelo logístico, que limita o crescimento populacional com base na razão entre densidade populacional e capacidade máxima de carga do tumor permitida (N_{max}) escrito de forma geral como:

$$\frac{dN}{dt} = k_g N \left(\frac{N_{max} - N}{N_{max}} \right) = k_g N \left(1 - \frac{N}{N_{max}} \right) \quad (2.14)$$

A Equação (2.14) estabelece que se o tamanho do tumor $N \ll N_{max}$, então $(1 - N/N_{max}) \approx 1$, e o crescimento é aproximadamente exponencial conforme dado pela Eq.(2.13). A medida que a população tumoral cresce de forma que N aproxima-se de N_{max} então, $(1 - N/N_{max}) \rightarrow 0$ e, portanto, cessa o crescimento do tumor.

Diversas funções da dinâmica da taxa de crescimento com aplicabilidade em modelos tumorais têm sido discutidas na literatura (BENZEKRY et al., 2014). Um modelo reportado na literatura consiste no crescimento de tumores baseado na equação de Gompertz para reproduzir o crescimento biológico que desacelera com o tamanho do tumor (N) e pode ser escrita como:

$$\frac{dN}{dt} = k_g N \ln \left(\frac{N_{max}}{N} \right) \quad (2.15)$$

Embora os modelos de equação diferencial ordinária tenham se mostrado como uma ferramenta útil para simular a evolução do número total de células tumorais ao longo do tempo, a deficiência mais evidente dessa abordagem é a falta de consideração da variação

especial. Invasão do câncer e propagação metastática são dois processos cruciais e inerentemente espaciais, que podem ser simulados usando modelos de equação diferencial parcial (EDP).

A abordagem das equações diferenciais parciais frequentemente empregadas para modelagem de câncer são modelos de reação-difusão (JARRETT et al., 2018). Modelos baseados em reações-difusão usam termos matemáticos específicos para caracterizar a difusão e proliferação das várias "espécies" no tumor como, por exemplo, células saudáveis, células cancerosas ou outros componentes teciduais como a matriz extracelular. De forma geral a equação pode ser escrita como:

$$\frac{\partial n(x,t)}{\partial t} = \nabla \cdot [D \nabla n(x,t)] + k_g n(x,t) \quad (2.16)$$

em que k_g representa uma taxa de crescimento, podendo assumir as formas descritas anteriormente, D representa o coeficiente de difusividade. O termo $(\nabla \cdot (D \nabla n(x,t)))$ representa o termo difusivo que refere-se à mobilidade geral e ao movimento das células de maior para menor densidade celular. Portanto, esta equação pode representar populações de células tumorais mudando no espaço e no tempo, onde se proliferam de acordo com um termo de crescimento definido e se espalham de acordo com a magnitude do coeficiente de difusão (JARRETT et al., 2018).

Um dos primeiros modelos matemáticos considerando-se os efeitos espacial e temporal da invasão do câncer foi desenvolvido por Gatenby e Gawlinski (1996). Este modelo considerou o efeito do excesso de íons H^+ na degradação do tecido local, permitindo que as células cancerígenas se difundissem e se proliferassem no espaço criado. Para isso, foi proposto um sistema de EDPs utilizadas para modelar a evolução espaço-temporal das células cancerosas que consideraram a interação com células normais e a produção de íons H^+ .

Enquanto modelos contínuos descrevem uma média das interações entre células tumorais ou com outras células do corpo, modelos discretos são capazes de reproduzir heterogeneidade celular distinta dentro da massa tumoral e dinâmica celular individual para proliferação (GERLEE; ANDERSON, 2008; LOLAS; CHAPLAIN, 2006; SHAMSI et al., 2018). Modelos discretos têm a vantagem de capturar comportamentos e interações celulares individuais entre as células, definindo componentes distintos ou individuais para cada sinal celular ou químico. Modelos discretos são frequentemente usados em modelos em várias escalas que combinam os efeitos de mais de uma camada da dinâmica de

proliferação de células tumorais, como a sinalização intra e intercelular. Contudo, isso se dá com um aumento no custo computacional devido ao grande número de equações necessárias para governar todas as interações dentro do sistema.

Autômatos celulares são modelos matemáticos discretos que simulam sistemas complexos por regras bem definidas. É definido distribuindo células idênticas dentro de uma rede espacial regular. Cada célula tem um valor, ou "estado", que é atualizado a cada passo de tempo com base em um conjunto de regras pré-definidas descrevendo explicitamente como a enésima célula muda com base em seu estado e nos estados de seus vizinhos. Neste caso, a probabilidade de uma célula tumoral proliferar ou morrer pode ser baseada na disponibilidade de nutrientes, concentração de um sinal intercelular ou fármacos (LOLAS; CHAPLAIN, 2006).

Na atualidade não existe um modelo focado no estudo de culturas de células tumorais em dispositivos microfluídicos, considerando diferentes geometrias do chip; proliferação e morte por distintas causas. Diante disso, o presente trabalho se propõe a elaborar um modelo que contempla todos estes elementos.

CAPÍTULO III

MATERIAIS E MÉTODOS

Este capítulo apresenta a metodologia usada para o desenvolvimento dos modelos propostos neste trabalho. A abordagem empregada consistiu de duas etapas, sendo que a primeira foi a implementação de modelos computacionais sem células, para estudar, dentre outros aspectos, como ocorre a distribuição de nutrientes no interior do dispositivo de microfluídica e a segunda etapa consistiu na implementação de modelos com células.

Na primeira parte deste capítulo é apresentada a geometria do dispositivo, seguida da apresentação da metodologia utilizada para estimar a distribuição de nutrientes no dispositivo de microfluídica sem célula. Para isso foram considerados diferentes condições de contorno bem como diferentes parâmetros do meio poroso, como porosidade e permeabilidade. Na sequência é apresentada a metodologia referente aos modelos matemáticos propostos para simular o comportamento das células no microdispositivo.

3.1. Descrição do dispositivo de microfluídica

A geometria do modelo foi baseada em um microdispositivo utilizado em um experimento (AYUSO et al., 2016), no qual os autores estudaram a influência, dentre outros, do gradiente de concentração da glicose e oxigênio sobre células tumorais de glioblastoma e de câncer de cólon. O dispositivo usado é composto por dois canais laterais e uma câmara central, conforme mostrado na Fig. 3.1. Os canais laterais podem exercer um papel

semelhante ao dos vasos sanguíneos, isto é, permitir o escoamento independente de nutrientes, oxigênio, fármacos, fatores de crescimento, dentre outros, a fim de promover o gradiente químico. A câmara central é o local onde é inserido o tecido artificial junto com as células que se deseja estudar.

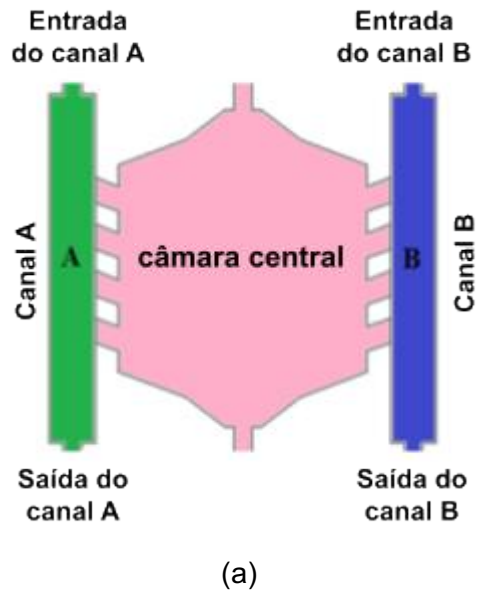


Figura 3.1 – (a) Esquema da geometria do dispositivo de microfluídica usado no modelo computacional: canais laterais A e B (verde e azul respectivamente) responsáveis pelo transporte de substâncias de interesse e a câmara central (rosa) que representa o local onde são confinadas as células tumorais imersas em uma matriz porosa (b) microchip referência utilizado por Ayuso et al. (2016).

3.2. Modelo para avaliar o transporte de substâncias

Para avaliar o padrão espaço-temporal de glicose foi desenvolvido um modelo computacional de um microchip (Fig. 3.2) com base nas principais características do dispositivo de microfluídica projetado por Ayuso et al. (2016), conforme descrito na seção 3.1. Na Figura 3.2 são mostradas as principais dimensões do chip.

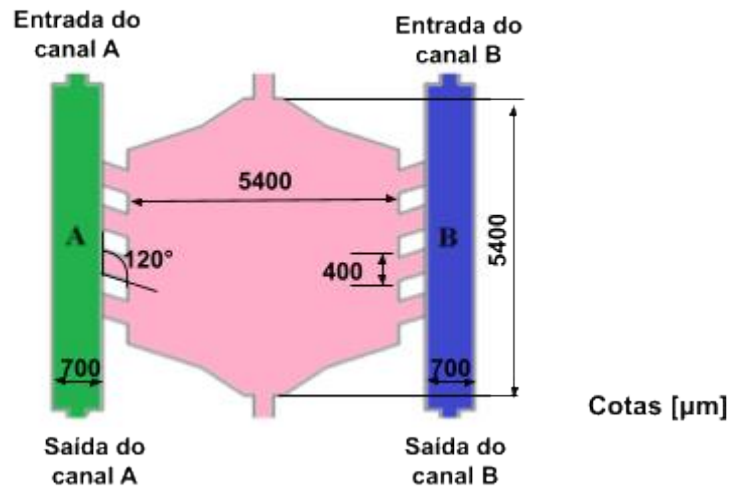


Figura 3.2- Geometria do dispositivo de microfluídica com suas principais dimensões.

Os modelos foram desenvolvidos utilizando o *software* comercial de elementos finitos COMSOL *Multiphysics*® versão 5.1. As simulações computacionais foram realizadas em um computador com processador Intel Core i5, 1.60 GHz, 8GB de RAM e sistema operacional Windows.

3.2.1. Descrição do modelo

É descrito na literatura que a difusão pode ser estudada como um fenômeno essencialmente plano dentro dos microdispositivos (CÓNDOR et al., 2018). Dessa forma, para analisar o efeito da porosidade e permeabilidade da matriz porosa sobre a distribuição espaço-temporal da glicose, foi desenvolvido um modelo geométrico bidimensional em elementos finitos cuja geometria está apresentada na Fig. 3.2.

O modelo é formado por um sistema de equações diferenciais dado pelas Eq.(2.7), Eq.(2.8) e Eq.(2.9), conforme descrito no capítulo II, e discutido com detalhes no capítulo IV, que permitem representar o escoamento do fluido e o transporte de substâncias dentro do dispositivo de microfluídica. As simulações desta etapa consistem na solução de um problema de escoamento laminar para baixos números de Reynolds (*Creeping flow*) acoplado com a transferência de massa, ou seja, o transporte de substâncias diluídas (*Transport of diluted species*).

3.2.2. Condições usadas para a solução do modelo

Na prática experimental, o meio de cultura é inserido usando uma micropipeta. Dessa forma, a fim de representar uma situação experimental, foi considerado que o meio de cultura foi inserido na entrada dos canais laterais A e B (Fig. 3.1a) durante um período de 10 s. Assim, a condição de contorno (C.C) para o escoamento laminar consiste de uma vazão na entrada dos canais laterais corresponde ao escoamento do meio de cultura e, a C.C da saída dos canais é de pressão manométrica igual a zero, isto é, correspondente à pressão atmosférica. Para o transporte de substâncias diluídas, a C.C na entrada dos canais laterais corresponde à concentração de glicose do meio de cultura, isto é, 5,5 mM. A condição inicial adotada é de concentração nula de glicose em todo o domínio do dispositivo de microfluídica.

Para efeitos de comparação, o tempo de simulação foi de 90 min baseando-se nos trabalhos de Ayuso et al. (2016). Destaca-se que esse tempo total de 90 min foi particionado em dois, sendo o tempo inicial correspondente ao escoamento do meio de cultura na entrada dos canais laterais, e a segunda parte corresponde ao tempo restante da análise. Assim, a primeira partição relativa à vazão do meio de cultura é de 10 s e passo tempo de 0,05 s. Já a segunda partição consiste do tempo restante para análise que compreende o instante de 10 s até 90 min e passo de tempo de 2 s.

A temperatura considerada em todas as simulações foi de 37 °C. Dessa forma, propriedades como viscosidade dinâmica e densidade foram consideradas a partir da interpolação relativo aos valores da água, com valores 0,0006495 kg/(m·s) e 993 kg/m³ respectivamente para viscosidade e densidade, sendo similares aos valores referentes ao meio de cultura (SUHAIMI et al., 2015), uma vez que é constituído principalmente por água.

Na Figura 3.3 é apresentado um fluxograma que descreve o processo para modelar o padrão espaço-temporal de glicose no dispositivo de microfluídica proposto para o estudo da influência da porosidade e permeabilidade e diferentes condições de contorno usando o método de elementos finitos.

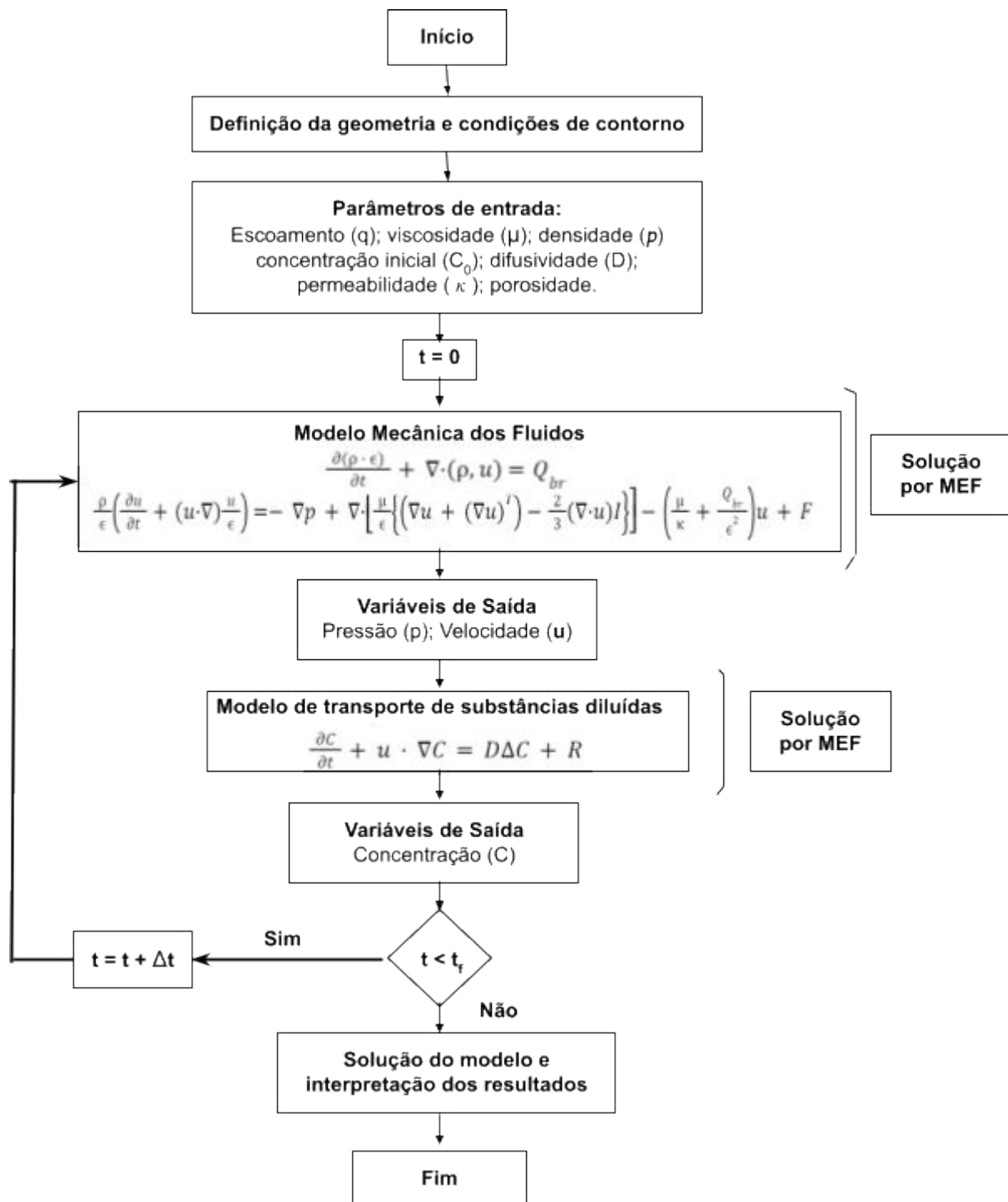


Figura 3.3 – Fluxograma proposto para estudar a influência da permeabilidade e porosidade dos hidrogéis na distribuição espaço-temporal da glicose no dispositivo de microfluídica.

Para avaliar a influência dos parâmetros físicos e propriedades da matriz porosa na distribuição da glicose no interior do dispositivo de microfluídica foram considerados o efeito da vazão na entrada dos canais laterais e a variação das propriedades do hidrogel, ou seja,

a permeabilidade e a porosidade. Em seguida foi conduzido um estudo comparativo entre os hidrogéis de fibrina e colágeno tipo I, comumente utilizados na prática experimental conforme descrito a seguir.

a. Efeito da vazão

Para avaliar o efeito da vazão do meio de cultura na entrada dos canais laterais sobre o gradiente de glicose no hidrogel, foram consideradas as vazões q_1 , q_2 e q_3 , referentes a introdução de 10 μ l, 300 μ l e 2 ml do meio de cultura na entrada dos canais laterais.

b. Efeito da variação da porosidade do hidrogel

Para analisar o efeito da variação da porosidade sobre o gradiente da glicose no hidrogel, foram consideradas os seguintes valores para porosidades: 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 0,95 e 0,99, baseados em valores reportados na literatura comumente observados nos hidrogéis (MORENO-AROTZENA et al., 2015; O'BRIEN et al., 2007; PLOU et al., 2018; POLACHECK et al., 2014; POLACHECK; CHAREST; KAMM, 2011b).

c. Efeito da variação da permeabilidade do hidrogel

Para avaliar a influência da permeabilidade foram considerados valores na faixa de 10^{-12} a 10^{-16} m², comumente encontrados para *scaffolds* utilizados na prática experimental conforme reportado na literatura (O'BRIEN et al., 2007; SWARTZ; FLEURY, 2007).

d. Estudo comparativo entre o hidrogel de colágeno tipo I e fibrina

Neste tópico foram considerados dois tipos específicos de hidrogéis usados em estudos biológicos: colágeno tipo I de densidade 2 mg/ml e fibrina, cujas propriedades foram baseadas no trabalho de Moreno-Arotzena et al. (2015).

As análises foram conduzidas considerando-se dois casos com diferentes condições de contorno, a fim de analisar a influência desses hidrogéis na formação do gradiente de glicose, conforme descrito a seguir.

i. Caso 01 – Condição de Contorno: escoamento

No primeiro caso foram considerados os canais laterais A e B alimentados com uma vazão q_1 durante 10 s, e um tempo de 90 min de análise. Foi imposta a máxima concentração na entrada do canal A simulando a entrada da solução contendo glicose e uma concentração nula no canal B. As saídas dos canais foram mantidas à pressão constante igual a pressão atmosférica.

ii. Caso 02 – Condição de Contorno: pressão constante

No segundo caso foi adotada condição de contorno considerando-se um gradiente de pressão Δp no canal lateral A e pressão manométrica nula no canal B. Isso simula uma situação em que se utiliza microbombas ou dispositivos de microfluídica que possuem colunas de fluido nas extremidades dos canais laterais na qual a diferença de altura dessas colunas de fluido é responsável pelo gradiente de pressão.

Os parâmetros usados nas análises do gradiente de concentração, bem como os valores das propriedades dos hidrogéis estão dispostos na Tab. 3.1.

Tabela 3.1 – Parâmetros usados na análise do gradiente de concentração de glicose no dispositivo para os hidrogéis de colágeno tipo I e fibrina

Símbolo	Variável	Valor
D_G	Difusividade da glicose	$9,5823 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$
κ	Permeabilidade	$\kappa_{\text{collagen}} = 10^{-12} \text{ m}^2$; $\kappa_{\text{fibrin}} = 5,73 \times 10^{-13} \text{ m}^2$
ϵ	Porosidade	$\epsilon_{\text{collagen}} = 0,8$; $\epsilon_{\text{fibrin}} = 0,7$
μ	Viscosidade dinâmica	$0,000649516 \text{ kg}/(\text{m}\cdot\text{s})$
ρ	Densidade	$993 \text{ kg}/\text{m}^3$
q	Vazão	$q_1 = 1 \text{ }\mu\text{l}/\text{s}$
Δp	Gradiente de pressão	$p = 40 \text{ Pa}$

3.2.3. Modelo matemático para estimar o campo de concentração de substâncias no interior do dispositivo de microfluídica via similitude

O campo de concentração de determinada substância é importante para o entendimento de diversos fenômenos relacionados ao comportamento celular. Neste trabalho é proposto um modelo matemático preliminar para estimar o gradiente de concentração no microchip via similitude.

O desenvolvimento da teoria da similitude baseia-se na análise dimensional, utilizando os conceitos de medidas e de observações do problema físico (MURPHY, 1950). Modelos de elementos finitos foram utilizados para obter a equação preditiva para o fenômeno estudado por meio de técnicas de similitude. O trabalho aqui proposto busca associar a similitude com dados obtidos na simulação numérica para determinar um modelo matemático representativo da distribuição espaço-temporal de substâncias no interior do dispositivo de microfluídica, ou seja, determinar a equação preditiva considerando-se as variáveis de influência do fenômeno físico relacionadas com o campo de concentração de substâncias no microchip. A seguir é apresentada a metodologia para a obtenção da equação preditiva.

A obtenção da equação preditiva foi baseada no teorema de Buckingham ou π -termos (MURPHY, 1950). Em termos gerais este teorema estabelece que o número de quantidades adimensionais independentes (s) requeridos para expressar uma relação entre as variáveis de qualquer fenômeno é igual ao número de quantidades ou variáveis envolvidas (n) menos o número de dimensões na qual estas quantidades são expressas (b). Assim, o teorema de Buckingham pode ser expresso pela Eq.(3.1).

$$s = n - b \quad (3.1)$$

De forma geral, os grupos adimensionais, ou seja, os π -termos podem ser expressos da seguinte forma:

$$\pi_1 = F(\pi_2, \pi_3, \dots, \pi_s) \quad (3.2)$$

Em geral a equação dada como função produto para um sistema envolvendo s π -termos é formado pela multiplicação das equações componentes (MURPHY, 1950) de acordo com a Eq. (3.3).

$$\pi_1 = F(\pi_2, \pi_3, \dots, \pi_s) = \frac{F(\pi_2, \bar{\pi}_3, \dots, \bar{\pi}_s) F(\bar{\pi}_2, \pi_3, \dots, \bar{\pi}_s) \cdots F(\bar{\pi}_2, \bar{\pi}_3, \dots, \pi_s)}{F(\bar{\pi}_2, \bar{\pi}_3, \bar{\pi}_4, \dots, \bar{\pi}_s)^{s-2}} \quad (3.3)$$

Na Equação (3.3) a barra indica que os parâmetros adimensionais serão mantidos constantes enquanto outros serão modificados visando analisar uma influência específica. Após completada a montagem das equações efetua-se um teste de validade utilizando um outro conjunto de dados, denotado por duas barras. Por exemplo, se a equação geral Eq.(3.3) tiver sido obtida mantendo-se constante π_3 em um determinado valor $\bar{\pi}_3$, então deve ser válida também se for determinada de uma série de dados na qual $\pi_3 = \bar{\pi}_3$, resultando:

$$\frac{F(\pi_2, \bar{\pi}_3, \bar{\pi}_4, \dots, \bar{\pi}_s)}{F(\bar{\pi}_2, \bar{\pi}_3, \bar{\pi}_4, \dots, \bar{\pi}_s)} \cong \frac{F(\bar{\pi}_2, \bar{\pi}_3, \bar{\pi}_4, \dots, \bar{\pi}_s)}{F(\bar{\pi}_2, \bar{\pi}_3, \bar{\pi}_4, \dots, \bar{\pi}_s)} \quad (3.4)$$

Portanto, se a Eq.(3.4) for satisfeita, a equação preditiva final pode ser combinada por uma função produto. O modelo matemático proposto para prever o campo de concentração no interior da câmara central foi desenvolvido considerando-se as variáveis que afetem o fenômeno físico (Tab.3.2). Neste caso, tem-se 11 variáveis e 4 quantidades primárias, que resulta em 7 π -termos.

Tabela 3.2 – Variáveis envolvidas no fenômeno físico com suas unidades e dimensões.

	Variáveis (n)	Unidades (SI)	Dimensões (b)
C_{gel}	concentração no interior da câmara central	mol/m ³	mol L ⁻³
C_o	concentração inicial na entrada do canal A	mol/m ³	mol L ⁻³
W_{ch}	largura dos canais laterais	m	L
W_{gel}	largura da câmara central	m	L
v	velocidade do fluido na entrada do canal A	m/s	L T ⁻¹
ρ	densidade do fluido	kg/m ³	M L ⁻³
μ	viscosidade dinâmica do fluido	Pa s	M L ⁻¹ T ⁻¹
D	difusividade do soluto	m ² /s	L ² T ⁻¹
k	permeabilidade do hidrogel	m ²	L ²
ϵ	porosidade do hidrogel	adimensional	----
d	distância no interior da câmara central a partir do canal A	m	L

Para todas as simulações a câmara central foi considerada preenchida de hidrogel, isto é, foi modelado como um meio poroso. Os parâmetros do meio poroso foram variados com base nos valores observados dos hidrogéis utilizados na prática experimental considerando-se os intervalos de $10^{-12} - 10^{-16} \text{ m}^2$ e $0,5 - 0,99$ para permeabilidade e porosidade respectivamente (O'BRIEN et al., 2007). Foi considerada uma velocidade constante para o escoamento de fluido na entrada do canal A e pressão constante ($P = 0$) nas extremidades do canal B e saída do canal A. A concentração do fluido no canal A foi ajustada para 1 mol/m^3 e nula no canal B. Foi considerada uma variação na difusividade do soluto na faixa $10^{-12} - 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$ visando abranger diferentes substâncias. Outra variação considerada foi referente à geometria do dispositivo de microfluídica, ou seja, as faixas de variação das dimensões da largura dos canais laterais e da largura da câmara central foram de $700 - 1100 \text{ }\mu\text{m}$ e $3400 - 5120 \text{ }\mu\text{m}$ respectivamente. Todos os resultados foram considerados para um tempo de análise de 1000 s.

3.2.4. Malha do modelo bidimensional

A malha usada no modelo de elementos finitos 2D é composta de 4 406 elementos triangulares com funções de forma lineares e 2 203 nós. Foram usados elementos de primeira ordem por serem simples e de baixo custo computacional. A malha foi definida após subseqüentes refinamentos, quando os resultados apresentaram diferenças menores que 5 % entre as malhas consecutivas e está formada por elementos variando entre 2,69 a $188 \text{ }\mu\text{m}$.

3.3. Modelo para avaliar o comportamento celular

Neste modelo a câmara central do microdispositivo (Fig. 3.1), onde estão as células de interesse, foi considerada preenchida por células tumorais imersas em um meio poroso de hidrogel de colágeno tipo I (AYUSO et al., 2016; MORENO-AROTZENA et al., 2015) que desempenha a função de arcabouço para essas células cancerosas. As equações diferenciais que compõem os modelos matemáticos para evolução celular (Eq.(3.5) e Eq.(3.6)) são apresentadas a seguir e discutidas com detalhes no capítulo IV. O modelo desenvolvido buscou representar um tumor avascular genérico, isto é, não existem vasos sanguíneos dentro do tumor. O suprimento de nutrientes é realizado apenas por meio dos canais laterais para o interior da câmara central.

$$\frac{\partial n(x,t)}{\partial t} = \nabla \cdot (D_n \nabla n) + k_p n H_p - k_d n H_d \quad (3.5)$$

$$\frac{\partial n(x,t)}{\partial t} = \nabla \cdot (D_n \nabla n) + f_p n \left(1 - \frac{n}{n_{max}}\right) m_0 - f_d n - f_{dpH} n - k_{ap} n \quad (3.6)$$

Nesta etapa foi considerado um modelo geométrico tridimensional de espessura de 250 μm e as mesmas dimensões utilizadas no modelo geométrico bidimensional (Fig. 3.2) com exceção da largura da câmara central que, neste caso, foi de 2.200 μm . Foi considerada a câmara central (região destacada na cor rosa na Fig. 3.1), modelada como um meio poroso, completamente preenchida por hidrogel de colágeno tipo I, análogo aos ensaios experimentais realizados com dispositivos similares (AYUSO et al., 2016; MORENO-AROTZENA et al., 2015). Dessa forma, as equações propostas para modelar o comportamento celular, dado pelas Eq. (3.5) ou Eq. (3.6) são aplicadas somente no domínio da câmara central.

As simulações relacionadas com os modelos matemáticos consistem na solução de um problema de escoamento laminar (Eq.(2.8) e Eq.(2.9)) acoplado com o transporte de substâncias diluídas (Eq.(2.7)) e a formulação fraca correspondente aos modelos matemáticos usados para representar o comportamento celular (Eq. (3.5) e Eq. (3.6)) que foram resolvidos usando o COMSOL®.

3.3.1. Condições usadas na simulação do problema

Em todas as simulações computacionais foram considerados que a câmara central estava preenchida com hidrogel de colágeno tipo I de densidade 2 mg/ml, com porosidade e permeabilidade de 0,8 e 10^{-12} m^2 respectivamente (MORENO-AROTZENA et al., 2015).

O meio de cultura foi inserido na entrada dos canais laterais A e B durante um período de 20 s com vazão de 10 $\mu\text{l}/\text{min}$. A condição de contorno da saída dos canais corresponde à pressão manométrica igual a zero. A temperatura usada nas simulações foi de 37 °C em concordância com os valores usados na prática experimental.

De forma geral, foi considerado um período de três dias de análise com renovação do meio de cultura a cada 24 h, com exceção do estudo de caso que avaliou diferentes tempos de renovação do meio de cultura, conforme Caso 01 descrito na Tab. 3.3. A

renovação do meio de cultura ocorre na entrada dos canais laterais por meio de uma micropipeta. Para representar esta condição a simulação foi particionada em dois períodos distintos. A primeira partição consiste no tempo correspondente à vazão do fluido com o meio de cultura, sendo, portanto, de 20 s e passo de tempo de 0,05 s. A segunda partição consiste do tempo restante para análise que compreende o intervalo de tempo da renovação do meio de cultura, sendo de 24 h nos modelos propostos e passo de tempo de 2 s.

a. Estudos de caso dos modelos com célula

Foram avaliados diferentes estudos, considerando algumas possíveis configurações experimentais que podem ser conduzidas com um dispositivo similar de microfluídica, considerando-se os modelos com células conforme sumarizados no Tab. 3.3.

Tabela 3.3 - Descrição dos estudos de caso para diferentes configurações experimentais.

Casos	Descrição	Variação
Caso 1	Mudança do regime de renovação	a. $t = 6$ h b. $t = 12$ h c. $t = 24$ h
Caso 2	Variação da densidade inicial de células	a. $n_o = 1 \times 10^4$ cel/ml b. $n_o = 1 \times 10^5$ cel/ml c. $n_o = 1 \times 10^6$ cel/ml d. $n_o = 4 \times 10^6$ cel/ml e. $n_o = 10 \times 10^6$ cel/ml f. $n_o = 40 \times 10^6$ cel/ml
Caso 3	Variação da geometria do chip (largura dos canais laterais e da câmara central).	a. $L_{new} = 0,7 \times L_{channel}$ b. $L_{new} = 1,5 \times L_{channel}$ c. $W_{new} = 0,5 \times W_{chamber}$ d. $W_{new} = 1,5 \times W_{chamber}$
Caso 4	variação do pg para $n_o = 1 \times 10^6$ (cel/ml)	a. $pg = 1$ b. $pg = 5$
Caso 5	escoamento contínuo do meio de cultura por um período de tempo de 30 min	$Q = 10 \mu\text{l}/\text{min}$

3.3.2. Malha do modelo tridimensional

O modelo de elementos finitos 3D baseado em uma geração de malha automática é composta de elementos tetraédricos e triangulares com funções de forma linear para a solução do campo de velocidade e pressão, correspondente à física do escoamento laminar, e para o campo de concentração de substâncias diluídas, por serem mais simples e de menor custo computacional e função de forma quadrática para a solução das equações diferenciais que descrevem a densidade de células por meio da formulação fraca uma vez que confere maior estabilidade na solução. A malha foi definida após subsequentes refinamentos, quando os resultados apresentaram diferenças menores que 5 % entre as malhas consecutivas e é composta por elementos variando entre 56,3 a 183 μm

3.3.3. Formulação Fraca usada para a solução.

A formulação forte de um modelo consiste nas equações diferenciais parciais juntamente com as condições de contorno do fenômeno que se pretende estudar. A formulação fraca representa essas equações em forma integral e é equivalente à equação de governo e suas condições de contorno, isto é, a formulação forte (FISH; BELYTSCHKO, 2007).

O modelo matemático proposto foi implementado no COMSOL® utilizando o módulo que usa a formulação fraca para implementar o método dos elementos finitos. Para isso, foi obtida a formulação fraca que modela os fenômenos de interesse e em seguida implementada seguindo a linguagem de programação específica do *software*.

A seguir é apresentada a obtenção da formulação fraca a partir da formulação forte referente ao primeiro modelo matemático dado pela Eq. (3.5), descrito com detalhes no item 4.2.1. A metodologia para a obtenção da formulação fraca para qualquer outra equação diferencial é obtida de forma semelhante. O fenômeno físico de interesse é modelado pela Eq. (3.5) juntamente com as condições de contorno e inicial, e, portanto, a formulação forte consiste em determinar a densidade celular $n \in N^2(\Omega)$ conforme Eq.(3.5).

$$\frac{\partial n}{\partial t} = \nabla \cdot (D_n \nabla n) + k_p H_p n - k_d H_d n \text{ em } \Omega$$

$$\frac{\partial n}{\partial e} = 0 \text{ em } \Gamma \quad (3.5)$$

$$n = n_0 \text{ em } t = t_0$$

em que Ω indica o domínio e Γ o seu contorno. N^2 indica que a função é duas vezes continuamente diferenciável, e representa a direção normal ao contorno do domínio Ω . Assim, a obtenção da formulação fraca consiste em multiplicar a equação diferencial por uma função teste (V), também conhecida como função peso ou função ponderação, arbitrária e integrar ambos os lados da equação no domínio Ω , conforme Eq. (3.6)

$$\int_{\Omega} \frac{\partial n}{\partial t} V d\Omega = \int_{\Omega} (\nabla \cdot (D_n \nabla n) + k_p H_p n - k_d H_d n) V d\Omega \quad (3.6)$$

Considerando a difusividade celular constante, é possível escrever a Eq. (3.6) como

$$\int_{\Omega} \frac{\partial n}{\partial t} V d\Omega = \int_{\Omega} (D_n \Delta n) V d\Omega + \int_{\Omega} (k_p H_p n - k_d H_d n) V d\Omega \quad (3.7)$$

Neste caso, Δ denota o laplaciano, ou seja,

$$\Delta n = \nabla \cdot \left(\frac{\partial^2 n}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 n}{\partial y^2} \right)$$

Utilizando a identidade de Green na primeira integral do lado direito da igualdade da Eq. (3.7) tem-se:

$$\int_{\Omega} \frac{\partial n}{\partial t} V d\Omega = - \int_{\Omega} (D_n \nabla n \cdot \nabla V) d\Omega + \int_{\Gamma} D_n V \frac{\partial n}{\partial e} d\Gamma + \int_{\Omega} (k_p H_p n - k_d H_d n) V d\Omega \quad (3.8)$$

A segunda integral depois da igualdade, que corresponde a uma integral de contorno, pode ser considerada nula para a implementação no *software*. Assim, a Eq. (3.8) pode ser escrita como:

$$\int_{\Omega} \frac{\partial n}{\partial t} V d\Omega + \int_{\Omega} (D_n \nabla n \cdot \nabla V) d\Omega - \int_{\Omega} (k_p H_p n) V d\Omega + \int_{\Omega} (k_d H_d n) V d\Omega = 0 \quad (3.9)$$

os gradientes de concentração e da função testes são escritos como:

$$\nabla n = \left[\frac{\partial n}{\partial x}, \frac{\partial n}{\partial y} \right]^T \quad \nabla V = \left[\frac{\partial V}{\partial x}, \frac{\partial V}{\partial y} \right]^T$$

Portanto, reescrevendo a integral anterior tem-se que:

$$\int_{\Omega} \frac{\partial n}{\partial t} V d\Omega + \int_{\Omega} D_n \left[\frac{\partial n}{\partial x} \frac{\partial V}{\partial x} + \frac{\partial n}{\partial y} \frac{\partial V}{\partial y} \right] d\Omega - \int_{\Omega} (k_p H_p n) V d\Omega + \int_{\Omega} (k_d H_d n) V d\Omega = 0 \quad (3.10)$$

Para implementação da Eq. (3.10) no *software* COMSOL® é adicionada a uma interface para modelagem de equações diferenciais parciais usando a formulação fraca (*weak form interface*). Assim, a equação é escrita na forma apropriada considerando-se a linguagem de programação do *software*.

3.4. Solução dos modelos

Usando as malhas apresentadas nas seções 3.3.1.1 e 3.2.2.2. e o método de elementos finitos com esquema de diferenciação implícita (BDF - *Backward Differentiation Formula*) com passo de tempo variável e o método iterativo de Newton-Raphson foram resolvidas as equações do modelo. Para os problemas que envolvem os módulos de transporte de substâncias diluídas, escoamento em regime laminar e formulação fraca em regime transiente, o COMSOL® utiliza o método BDF para aproximar as derivadas no tempo.

CAPÍTULO IV

MODELOS MATEMÁTICOS

Neste capítulo são apresentados todos os modelos matemáticos usados para representar a distribuição de substâncias (glicose, oxigênio e íons de H⁺) dentro de um dispositivo de microfluídica e como esta distribuição influencia na proliferação e morte celular.

4.1. Modelo matemático para representar o transporte de substâncias

O primeiro modelo desenvolvido considerou a câmara central de um microdispositivo preenchida com um hidrogel, que foi representado por um material poroso como, por exemplo, hidrogel de colágeno tipo I ou fibrina, comumente utilizados como matriz extracelular em microchips para recriar o microambiente celular *in vitro* (MORENO-AROTZENA et al., 2015).

Para caracterizar os hidrogéis foram usados os parâmetros: porosidade e permeabilidade. Esses parâmetros foram variados em intervalos comuns de hidrogéis usados na prática experimental (O'BRIEN et al., 2007), a porosidade na faixa de 0,5 – 0,99 e a permeabilidade de 10^{-16} – 10^{-12} m². Na sequência, foi avaliada a distribuição de glicose

considerando-se dois hidrogéis frequentemente usados para cultura de célula: colágeno tipo I e de fibrina.

Este primeiro modelo consiste das equações de escoamento laminar para baixos Re em um meio poroso acoplado com as equações do transporte de substâncias diluídas. O domínio em que as células são inseridas consiste de um meio poroso formado por hidrogel, em que ocorre o transporte de massa como, por exemplo, nutrientes, O_2 , citocinas, fármacos, dentre outros. Em seguida serão descritas as características e as principais equações que regem os fenômenos utilizados neste trabalho.

4.1.2. Modelagem de escoamento e de transporte de massa em meios porosos

Um meio poroso é definido como uma matriz de material sólido consistindo de vazios interconectados. Esses materiais são caracterizados pela sua porosidade (ϵ), permeabilidade (κ) e tortuosidade (τ) (KHALED; VAFAI, 2003).

O transporte de massa dentro do interstício é crucial para a manutenção das células intersticiais e é promovido pela difusão e advecção de acordo com o balanço geral de massa, modelado matematicamente pela Eq.(4.1) de reação-advecção-difusão, ou seja,

$$\frac{\partial C_i(x,t)}{\partial t} + u_i \cdot \nabla C_i(x,t) = D_i \Delta C_i(x,t) + R_i \quad (4.1)$$

em que $C_i(x,t)$ representa a concentração do soluto (mol/m^3); u_i é o vetor velocidade do soluto (m/s); D_i denota a difusividade (m^2/s) do soluto i ; R_i representa o termo de reação que pode ser uma taxa de consumo ou produção ($\text{mol}/\text{m}^3/\text{s}$); ∇C_i representa o gradiente da espécie i . Nos modelos propostos neste trabalho, o termo de reação pode representar a taxa de consumo de nutrientes (glicose) e O_2 e a produção de H^+ pelas células cancerosas. Ademais, devido às baixas velocidades do escoamento intersticial, e pautando-se pelo número de Peclet, o termo advectivo ($u_i \cdot \nabla C_i(x,t)$) pode ser desprezado (SWARTZ; FLEURY, 2007).

O escoamento no hidrogel, representado por um meio poroso, é governado pela combinação da equação de continuidade e *momentum*, que juntas formam a equação de Brinkman, conforme apresentado pelas Eq.(4.2) e Eq.(4.3) a seguir.

$$\frac{\partial(\rho \epsilon)}{\partial t} + \nabla \cdot (\rho u) = Q_{br} \quad (4.2)$$

$$\frac{\rho}{\epsilon} \left(\frac{\partial u}{\partial t} + (u \cdot \nabla) \frac{u}{\epsilon} \right) = -\nabla p + \nabla \cdot \left\{ \frac{\mu}{\epsilon} \left[(\nabla u + (\nabla u)^T) - \frac{2}{3} (\nabla \cdot u) I \right] \right\} - \left(\frac{\mu}{\kappa} + \frac{Q_{br}}{\epsilon^2} \right) u + F \quad (4.3)$$

Nas Equações (4.2) e (4.3), μ representa a viscosidade dinâmica do fluido [kg/(m·s)], u a velocidade (m/s), ρ é a densidade do fluido (kg/m³), p a pressão (Pa), ϵ a porosidade, κ a permeabilidade do meio poroso (m²) e Q_{br} uma fonte ou sumidouro mássico [kg/(m³·s)]. A influência da gravidade ou outras forças de campo podem ser contabilizadas pelo termo F [kg/(m²·s²)], apesar de serem negligenciadas nas simulações do presente estudo, junto com o termo inercial $(u \cdot \nabla)u/\epsilon$.

4.1.2.1. Difusão em meios porosos

A difusão é um dos principais mecanismos de transporte da substância em meios biológicos. O coeficiente de difusão da glicose foi calculado usando a formulação de Stokes-Einstein (EINSTEIN, 1905), conforme Eq.(4.4), que define a difusão de um elemento de raio r imerso em um fluido contínuo

$$D_{\infty} = \frac{k_B \cdot T}{6\pi\mu r} \quad (4.4)$$

em que k_B é a constante de Boltzmann com valor de $1,3807 \times 10^{-23}$ J/K, T corresponde a temperatura em K, μ denota a viscosidade dinâmica do fluido em kg/(m·s) e r o raio da glicose com valor de $3,65 \times 10^{-10}$ m (SUHAIMI et al., 2015; SUHAIMI; WANG; DAS, 2015).

Considerando a temperatura empregada nos ensaios experimentais *in vitro* de 37 °C, a viscosidade correspondente é 0,000649516 kg/(m·s) (SUHAIMI et al., 2015). Portanto, para $T = 37$ °C, considerando-se a Eq.(4.4), a difusividade da glicose em meio contínuo é $D_G = 9,582 \times 10^{-10}$ m²/s.

O transporte de biomoléculas solúveis no interior de matrizes de hidrogel sintético dependem não somente das propriedades do soluto mas também do meio poroso. Assim, considerando-se que as moléculas se difundem numa matriz porosa, a difusividade deve ser corrigida.

A difusividade efetiva em um meio poroso, denotado por D_{eff} , depende da estrutura dos poros do material e das fases envolvidas e é definida conforme o transporte da substância diluída ocorre em meio livre, meio poroso saturado ou parcialmente saturado.

Considerando-se os modelos propostos neste trabalho, a difusão irá ocorrer em meio poroso saturado. Assim, a difusividade efetiva pode ser determinada pelo modelo de Millington e Quirk que correlaciona a porosidade e tortuosidade (MILLINGTON; QUIRK, 1961) dada pela Eq.(4.5)

$$D_{eff} = \frac{\epsilon}{\tau} D_{\infty} \quad (4.5)$$

em que D_{∞} denota o coeficiente de difusão (m^2/s) para uma espécie diluída em um meio livre, ϵ representa a porosidade e τ corresponde ao fator tortuosidade (adimensional). A tortuosidade representa a interconectividade dos poros. Canais tortuosos dificultam o movimento das moléculas e essa resistência é incluída pelo fator de tortuosidade.

O COMSOL® permite a utilização de valores de tortuosidade definidos pelo usuário e também possui alguns modelos predefinidos para o cálculo da tortuosidade. Para o cálculo da difusividade efetiva foram avaliados os modelos predefinidos, isto é, o modelo Millington e Quirk e o modelo de Bruggeman que relacionam a tortuosidade com a porosidade de acordo com as expressões $\tau = 1/\epsilon^{0,33}$ e $\tau = \epsilon^{-1/2}$ respectivamente.

Na Figura 4.1 é apresentado um gráfico comparativo da difusividade efetiva da glicose para uma dada faixa de porosidade (0,5 – 0,99). Desta figura pode-se constatar que a medida que a porosidade aumenta a difusividade efetiva aproxima-se da difusividade do meio livre e, além disso, a diferença entre os modelos predefinidos no *software* reduz à medida que a porosidade aumenta. Ambos modelos apresentam valores próximos de difusividade efetiva dentro da faixa de variação de porosidade proposta neste estudo. Sendo assim, para os todos os casos avaliados sem célula neste trabalho, foi utilizado o modelo de tortuosidade Millington e Quirk predefinido no COMSOL®.

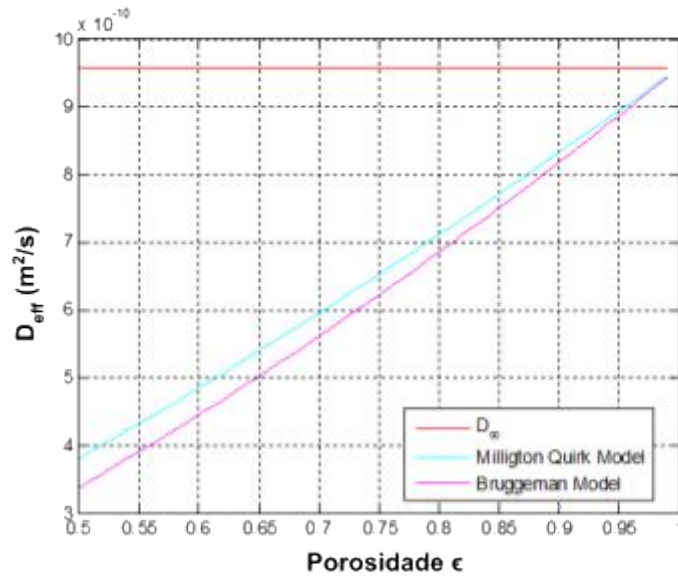


Figura 4.1 – Difusividade efetiva da glicose em um meio poroso considerando-se o modelo de Bruggeman e de Millington e Quirk (1961) da tortuosidade.

4.1.3. Modelo matemático para estimar o campo de concentração de substâncias no interior do dispositivo de microfluídica via similitude

Neste trabalho é proposto um modelo matemático preliminar via similitude para estimar o gradiente de concentração de determinada substância (nutrientes, fatores de crescimento, fármacos e etc.) no interior de um dispositivo de microfluídica considerando as variáveis de influência no fenômeno. Para isso, modelos computacionais usando o método dos elementos finitos foram utilizados para auxiliar na obtenção da equação preditiva.

A geometria bidimensional do modelo foi baseada em um microchip (Fig.3.1) conforme descrito no tópico 3.2 do capítulo III. Para a obtenção dos π -termos foi realizado um levantamento das variáveis envolvidas no fenômeno e escrita a equação da análise dimensional, conforme apresentado no item 3.2.3. A análise dimensional foi desenvolvida considerando-se as dimensões em que cada quantidade é expressa. Neste problema foram consideradas 11 variáveis e 4 dimensões ou quantidades primárias (Tab.3.2) e, portanto, este problema apresenta 7 π -termos. A concentração no interior da câmara central do dispositivo de microfluídica é dado em função das demais variáveis da seguinte forma:

$$C_{gel} = f(C_o, W_{ch}, W_{gel}, \nu, \rho, \mu, D, \kappa, \epsilon, d) \quad (4.6)$$

A validade do teorema dos π -termos pode ser estabelecida por uma análise da equação dimensional do fenômeno escrita como:

$$C_{gel}^{c_1}, C_0^{c_2}, W_{ch}^{c_3}, W_{gel}^{c_4}, v^{c_5}, \rho^{c_6}, \mu^{c_7}, D^{c_8}, \kappa^{c_9}, d^{c_{10}}, \epsilon^{c_{11}} = 0 \quad (4.7)$$

A Equação (4.7) pode ser escrita em termos das quantidades primárias, isto é, das dimensões básicas elevadas a coeficientes pertinentes dada pela Eq.(4.8).

$$(molL^{-3})^{c_1} (molL^{-3})^{c_2} (L)^{c_3} (L)^{c_4} (LT^{-1})^{c_5} (ML^{-3})^{c_6} (ML^{-1}T^{-1})^{c_7} (L^2T^{-1})^{c_8} (L^2)^{c_9} (L)^{c_{10}} \quad (4.8)$$

O passo seguinte consiste em escrever as equações auxiliares. A fim de automatizar o processo de obtenção dos π -termos é proposto aqui a utilização da matriz dimensional. Essa matriz consiste na disposição dos expoentes das dimensões dos parâmetros de cada grandeza considerada no estudo. Em outras palavras, as linhas correspondem às grandezas fundamentais relacionadas com o problema – neste caso, mol; M; L e T. Cada coluna corresponde às grandezas consideradas no problema, neste caso, as n variáveis dispostas na Tab. 3.2. Assim, a matriz dimensional (Tab. 4.1) é de ordem $b \times n$, sendo n o número de colunas igual a número de parâmetros do problema e b o número de linhas, relacionados com as quantidades primárias.

Tabela 4.1 – Matriz dimensional

	C_{gel}	D	k	W_{ch}	W_{gel}	v	ρ	μ	C_o
mol	1	0	0	0	0	0	0	0	1
M	0	0	0	0	0	0	1	1	0
L	-3	2	2	1	1	1	-3	-1	-3
T	0	-1	0	0	0	-2	0	-1	0

A obtenção dos π -termos foi realizada considerando-se os seguintes passos:

i. Partição da matriz dimensional.

$$D_1 = \begin{array}{c|ccc} & C_{gel} & D & k \\ \hline mol & 1 & 0 & 0 \\ M & 0 & 0 & 0 \\ L & -3 & 2 & 2 \\ T & 0 & -1 & 0 \end{array}$$

$$D_2 = \begin{array}{c|ccccc} & W_{ch} & W_{gel} & v & \rho & \mu & C_o \\ \hline mol & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 \\ M & 0 & 0 & 0 & 1 & 1 & 0 \\ L & 1 & 1 & 1 & -3 & -1 & -3 \\ T & 0 & 0 & -2 & 0 & -1 & 0 \end{array}$$

ii. Cálculo do determinante da matriz D_1 . Caso seja igual a zero, deve-se escolher outra matriz D_1 .

iii. Inversão da matriz D_1

iv. Pré-multiplicação de D_2 por $(-D_1^{-1})$

v. Construir a seguinte matriz $\left| \begin{array}{c} (-D_1^{-1}) \cdot D_2 \\ I_{n-b} \end{array} \right|$

vi. obtenção dos π -termos.

Dessa forma, os π -termos propostos são:

$$\begin{aligned}\pi_1 &= \frac{C_{gel}}{C_0} \\ \pi_2 &= \frac{D \cdot \rho}{\mu} \\ \pi_3 &= \kappa \cdot v^{\frac{2}{3}} \left(\frac{\rho}{\mu} \right)^{\frac{4}{3}} \\ \pi_4 &= W_{gel} \cdot v^{\frac{1}{3}} \left(\frac{\rho}{\mu} \right)^{\frac{2}{3}} \\ \pi_5 &= W_{ch} \cdot v^{\frac{1}{3}} \left(\frac{\rho}{\mu} \right)^{\frac{2}{3}} \\ \pi_6 &= \epsilon \\ \pi_7 &= \frac{d}{W_{gel}}\end{aligned}$$

Considerando-se os 7 π -termos, tem-se que:

$$\pi_1 = F(\pi_2, \pi_3, \pi_4, \pi_5, \pi_6, \pi_7) \quad (4.9)$$

Escrevendo a expressão anterior em termos dos números adimensionais tem-se:

$$\frac{C_{gel}}{C_0} = F\left(\frac{D \cdot \rho}{\mu}, \kappa \cdot v^{\frac{2}{3}} \left(\frac{\rho}{\mu} \right)^{\frac{4}{3}}, W_{ch} \cdot v^{\frac{1}{3}} \left(\frac{\rho}{\mu} \right)^{\frac{2}{3}}, W_{gel} \cdot v^{\frac{1}{3}} \left(\frac{\rho}{\mu} \right)^{\frac{2}{3}}, \epsilon, \frac{d}{W_{gel}}\right)$$

Para a obtenção dos π -termos constantes alguns parâmetros foram mantidos fixos, conforme apresenta a Tab.4.2.

Tabela 4.2 – Parâmetros de referência para o cálculo dos π –termos constantes.

Símbolo	Valor	Descrição / Nota	Referência
D	$9,582 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$	Difusividade da glucose	(SUHAIMI et al., 2015)
κ	10^{-12} m^2	Permeabilidade do hidrogel de colágeno tipo I	(MORENO-AROTZENA, Oihana et al., 2015)
ϵ	0,8	Porosidade do hidrogel de colágeno	(MORENO-AROTZENA, Oihana et al., 2015)
μ	$0,0006996 \text{ kg}/(\text{m} \cdot \text{s})$	Viscosidade da água a $T = 37 \text{ }^\circ\text{C}$	(BARISAM et al., 2017; SUHAIMI et al., 2015)
ρ	$993 \text{ kg}/\text{m}^3$	Densidade da água a $T = 37 \text{ }^\circ\text{C}$	(BARISAM et al., 2017)
v	$0,0125 \text{ m}/\text{s}$	Velocidade do fluido na entrada do canal	(AYUSO et al., 2016; ISHIDA et al., 2016)
$(x_{gel}; y_{gel})$	$(0; h/2)$	Coordenadas do ponto central do chip em que h refere-se à altura da câmara central, Este ponto foi tomado como referência para C_{gel} .	
W_{gel}	$5120 \text{ }\mu\text{m}$	Largura da câmara central do dispositivo	
W_{ch}	$800 \text{ }\mu\text{m}$	Largura da câmara central do dispositivo	

O cálculo dos π –termos constantes foram baseados nos valores dos parâmetros dispostos na Tab.4.2. Para simplificação esses π –termos estão dispostos na Tab.4.3.

Tabela 4.3 – π –termos constante baseados nos valores da Tab. 4.2.

π – termos constantes	Valores
$\bar{\pi}_2$	$\frac{D \cdot \rho}{\mu} = \frac{9,5823 \cdot 10^{-10} \times 993}{0,0006996} = 0,00136$
$\bar{\pi}_3$	$\kappa \cdot v^{\frac{2}{3}} \left(\frac{\rho}{\mu}\right)^{\frac{4}{3}} = 1 \cdot 10^{-12} \times 0,0125^{\frac{2}{3}} \left(\frac{993}{0,0006996}\right)^{\frac{4}{3}} = 8,5916 \cdot 10^{-6}$
$\bar{\pi}_4$	$W_{gel} \cdot v^{\frac{1}{3}} \left(\frac{\rho}{\mu}\right)^{\frac{2}{3}} = 5120 \cdot 10^{-6} \times 0,0125^{\frac{1}{3}} \left(\frac{993}{0,0006996}\right)^{\frac{2}{3}} = 15,0074$
$\bar{\pi}_5$	$W_{ch} \cdot v^{\frac{1}{3}} \left(\frac{\rho}{\mu}\right)^{\frac{2}{3}} = 800 \cdot 10^{-6} \times 0,0125^{\frac{1}{3}} \left(\frac{993}{0,0006996}\right)^{\frac{2}{3}} = 2,3449$
$\bar{\pi}_6$	$\epsilon = 0,8$
$\bar{\pi}_7$	$\frac{d}{W_{gel}} = \frac{2560}{5120} = 0,5$

Caso 1 – $\pi_1 = F(\bar{\pi}_2, \bar{\pi}_3, \bar{\pi}_4, \bar{\pi}_5, \bar{\pi}_6, \bar{\pi}_7)$

A primeira equação componente foi obtida considerando-se a variação de π_1 e π_2 e mantendo os demais π -termos constantes (Tab.4.3). Para isso, o estudo foi conduzido variando-se a difusividade (D) do soluto na faixa $10^{-12} - 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$, conforme descrito no

capítulo III, e mantendo os demais parâmetros constantes. Na Tabela 4.4 são apresentados os valores de D e C_{gel} utilizados para a obtenção dos π -termos.

Tabela 4.4 – Valores de D e C_{gel} para o cálculo dos π –termos π_1 e π_2

D	C_{gel} (mol/m ³)	$\pi_1 = \frac{C_{gel}}{C_0}$	$\pi_2 = \frac{D \cdot \rho}{\mu}$
1E-12	0,035133	0,035133	1,42E-06
1,44E-10	0,15325	0,15325	2,04E-04
2,86E-10	0,22605	0,22605	4,07E-04
4,29E-10	0,26802	0,26802	6,09E-04
5,72E-10	0,29526	0,29526	8,12E-04
7,15E-10	0,31406	0,31406	1,01E-03
8,57E-10	0,32788	0,32788	1,22E-03
1E-09	0,33865	0,33865	1,42E-03

De posse dos valores de π_1 e π_2 foi realizado um ajuste de curva conforme mostrado na Fig. 4.2 obtendo-se, dessa forma, a equação componente:

$$F(\pi_2, \bar{\pi}_3, \bar{\pi}_4, \bar{\pi}_5, \bar{\pi}_6, \bar{\pi}_7) = 3,0444 \cdot (\pi_2)^{0,3337} \quad (4.10)$$

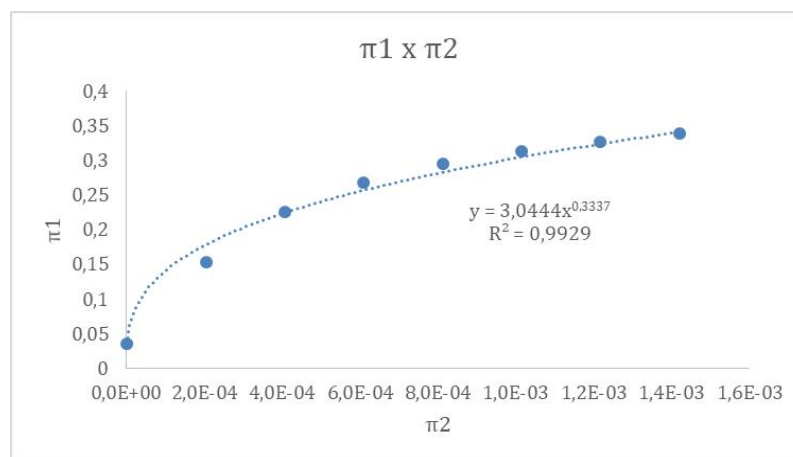


Figura 4.2 – Gráfico da função componente de π_1 em função de π_2 .

Caso 2 – $\pi_1 = F(\bar{\pi}_2, \bar{\pi}_3, \bar{\pi}_4, \bar{\pi}_5, \bar{\pi}_6, \bar{\pi}_7)$

A segunda equação componente foi obtida considerando-se a variação de π_1 e π_3 e mantendo os demais π -termos constantes (Tab.4.3). Para isso, o estudo foi conduzido variando-se a permeabilidade (κ) do meio poroso na faixa de 10^{-18} – 10^{-12} m², conforme descrito no capítulo III, e mantendo os demais parâmetros constantes. A Tabela 4.5 apresenta os valores de κ e C_{gel} utilizados na obtenção dos π -termos.

Tabela 4.5 – Valores de κ e C_{gel} para o cálculo dos π -termos π_1 e π_3 .

κ	C_{gel} (mol/m ³)	$\pi_1 = \frac{C_{gel}}{C_0}$	$\pi_3 = \kappa \cdot v^{\frac{2}{3}} \left(\frac{\rho}{\mu} \right)^{\frac{4}{3}}$
1E-18	0,029422	0,029422	8,59157E-12
1,67E-13	0,072329	0,072329	1,43194E-06
3,33E-13	0,15054	0,15054	2,86386E-06
5E-13	0,27123	0,27123	4,29579E-06
6,67E-13	0,42597	0,42597	5,72772E-06
8,33E-13	0,59325	0,59325	7,15964E-06
1E-12	0,7451	0,7451	8,59157E-06

De posse dos valores de π_1 e π_3 foi realizado um ajuste de curva conforme mostrado na Fig. 4.3 obtendo-se dessa forma a seguinte equação componente:

$$F(\bar{\pi}_2, \bar{\pi}_3, \bar{\pi}_4, \bar{\pi}_5, \bar{\pi}_6, \bar{\pi}_7) = 0,0418e^{372731\pi_3} \quad (4.11)$$

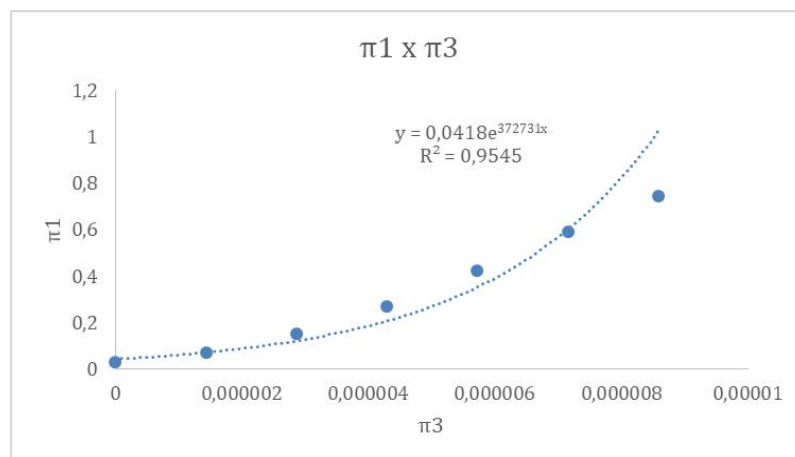


Figura 4.3 – Gráfico da função componente de π_1 em função de π_3 .

Caso 3 – $\pi_1 = F(\bar{\pi}_2, \bar{\pi}_3, \bar{\pi}_4, \bar{\pi}_5, \bar{\pi}_6, \bar{\pi}_7)$

A terceira equação componente foi obtida considerando-se a variação de π_1 e π_4 e mantendo os demais π -termos constantes (Tab.4.3). Para isso, o estudo foi conduzido variando a largura da câmara central (W_{gel}) dentro da faixa de 3400 – 5120 μm , conforme descrito no capítulo III. A Tabela 4.6 apresenta os valores de W_{gel} e C_{gel} utilizados na obtenção dos π -termos.

Tabela 4.6 – Valores de W_{gel} e C_{gel} para o cálculo dos π –termos π_1 e π_4

W_{gel} (m)	C_{gel} (mol/m ³)	$\pi_1 = \frac{C_{gel}}{C_0}$	$\pi_4 = W_{gel} \cdot v^{\frac{1}{3}} \left(\frac{\rho}{\mu} \right)^{\frac{2}{3}}$
0,00512	0,33553	0,33553	15,00743
0,004833333	0,41003	0,41003	14,16717
0,004546667	0,49187	0,49187	13,32691
0,00426	0,57718	0,57718	12,48665
0,003973333	0,65907	0,65907	11,64639
0,003686667	0,73723	0,73723	10,80613
0,0034	0,80886	0,80886	9,96587

De posse dos valores de π_1 e π_4 foi realizado um ajuste de curva mostrado na Fig. 4.4 obtendo-se, assim, a seguinte equação componente:

$$F(\bar{\pi}_2, \bar{\pi}_3, \bar{\pi}_4, \bar{\pi}_5, \bar{\pi}_6, \bar{\pi}_7) = 4,8664 e^{-0,175\pi_4} \quad (4.12)$$

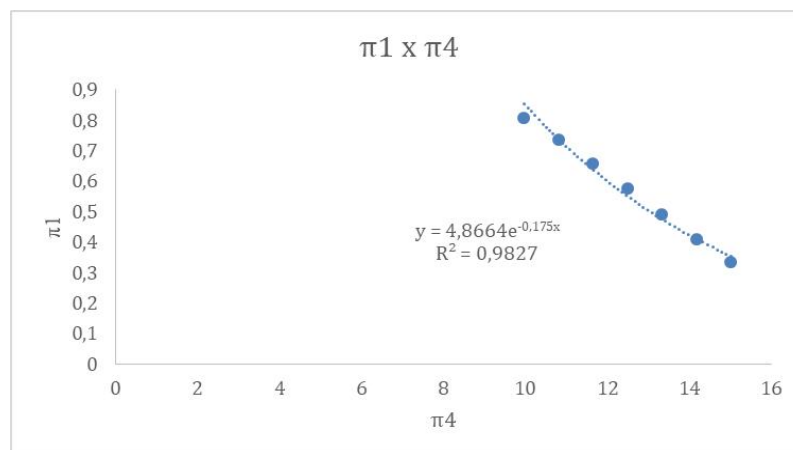


Figura 4.4 – Gráfico da função componente de π_1 em função de π_4 .

Na Figura 4.5 é apresentado o campo de concentração no interior do dispositivo de microfluídica considerando-se os valores extremos da faixa de W_{gel} utilizados na obtenção dos π –termos. É importante observar que a distribuição espacial do soluto, neste caso a glicose, difere consideravelmente com a variação da largura da câmara central. Isso pode motivar diferentes aplicações no campo da biologia. No entanto, cabe destacar que na presença de células o campo de concentração será diferente deste apresentado devido ao consumo da substância por parte das células ou mesmo em função da reação com a matriz porosa, conforme apresentado neste trabalho.

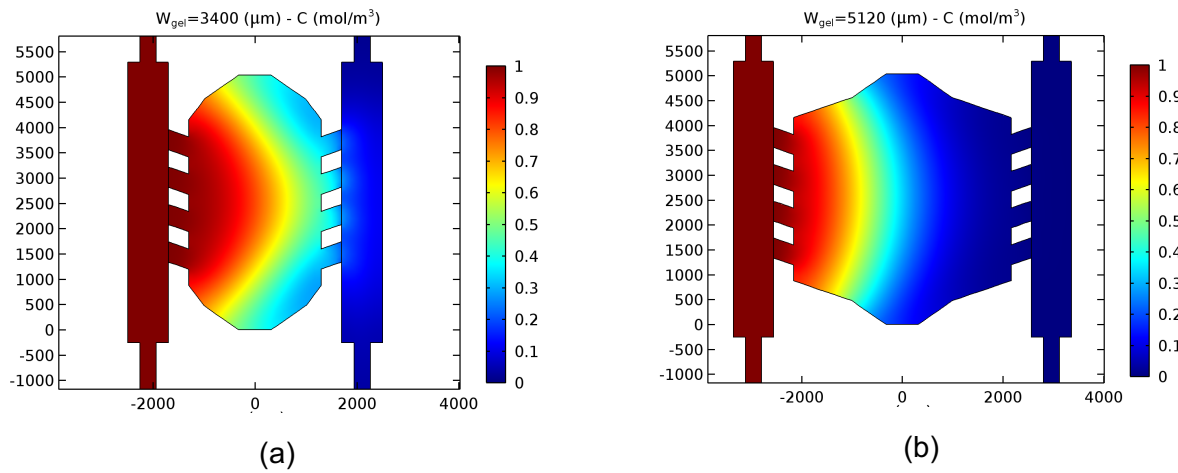


Figura 4.5 – Campo de concentração de glicose no interior do dispositivo de microfluídica para (a) $W_{gel} = 3400 \mu\text{m}$ (b) $W_{gel} = 5120 \mu\text{m}$

Caso 4 – $\pi_1 = F(\bar{\pi}_2, \bar{\pi}_3, \bar{\pi}_4, \bar{\pi}_5, \bar{\pi}_6, \bar{\pi}_7)$

A quarta equação componente foi obtida considerando-se a variação de π_1 e π_5 e mantendo os demais π -termos constantes (Tab.4.3). Para isso, o estudo foi conduzido variando a largura dos canais laterais (W_{ch}) dentro da faixa de 700 – 1100 μm . A Tabela 4.7 apresenta os valores de W_{ch} e C_{gel} utilizados na obtenção dos π -termos.

Tabela 4.7 – Valores de W_{ch} e C_{gel} para o cálculo dos π -termos π_1 e π_5 .

W_{ch} (m)	C_{gel} (mol/m ³)	$\pi_1 = \frac{C_{gel}}{C_0}$	$\pi_5 = W_{ch} \cdot v^{\frac{1}{3}} \left(\frac{\rho}{\mu} \right)^{\frac{2}{3}}$
0,0007	0,49666	0,49666	2,051797
0,000757	0,39536	0,39536	2,21929
0,000814	0,31869	0,31869	2,386784
0,000871	0,26092	0,26092	2,554278
0,000929	0,21952	0,21952	2,721771
0,000986	0,18534	0,18534	2,889265
0,001043	0,16041	0,16041	3,056758
0,0011	0,14129	0,14129	3,224252

De posse dos valores de π_1 e π_5 foi realizado um ajuste de curva conforme mostrado na Fig. 4.6 obtendo-se, dessa forma, a seguinte equação componente:

$$F(\bar{\pi}_2, \bar{\pi}_3, \bar{\pi}_4, \bar{\pi}_5, \bar{\pi}_6, \bar{\pi}_7) = 3,6706 \cdot (\pi_5)^{-2,803} \quad (4.13)$$

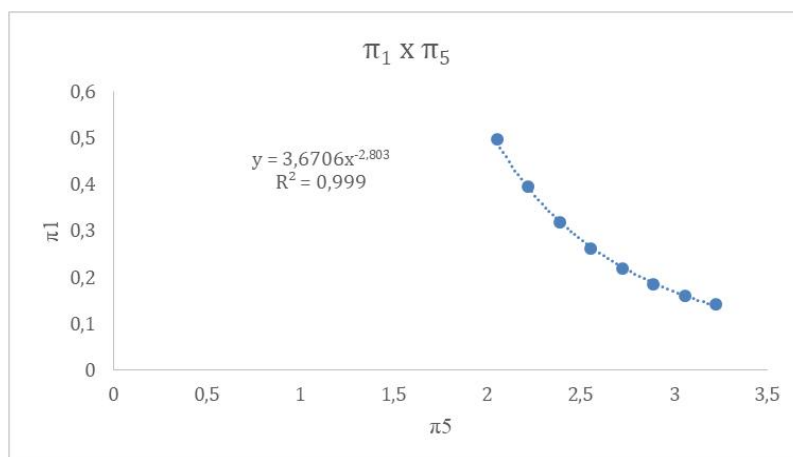


Figura 4.6 – Gráfico da função componente de π_1 em função de π_5 .

Na Figura 4.7 é apresentado o campo de concentração no interior do microchip considerando-se os valores extremos da faixa de W_{ch} utilizados na obtenção dos π -termos. Observa-se que quanto maior a largura do canal lateral menor a resistência do escoamento ao longo do canal e, aliado à resistência da matriz porosa, tem-se um menor o escoamento no interior da matriz de hidrogel.

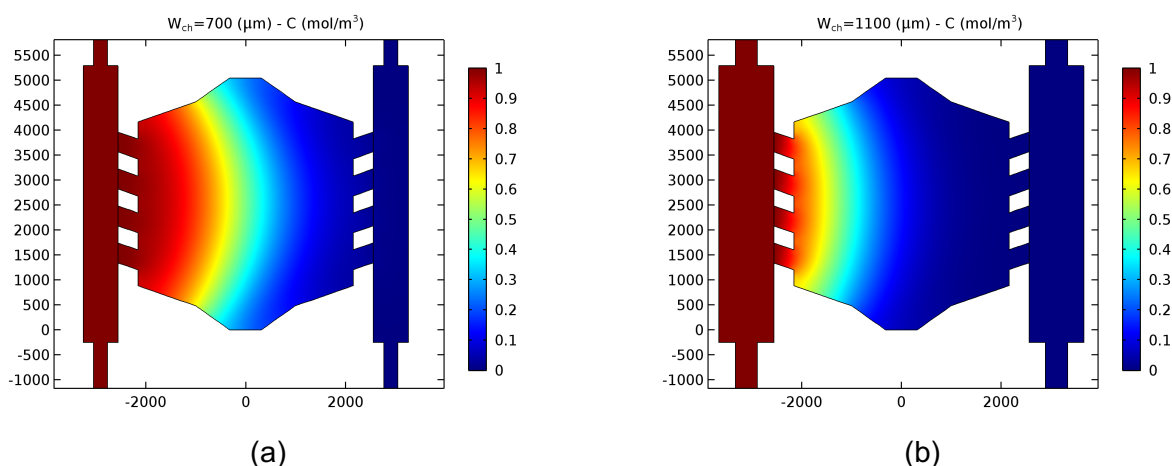


Figura 4.7 – Campo de concentração de glicose no interior do dispositivo de microfluídica para (a) $W_{ch} = 700 \mu\text{m}$ (b) $W_{ch} = 1100 \mu\text{m}$.

Caso 5 – $\pi_1 = F(\bar{\pi}_2, \bar{\pi}_3, \bar{\pi}_4, \bar{\pi}_5, \pi_6, \bar{\pi}_7)$

A quinta equação componente foi obtida considerando-se a variação de π_1 e π_6 e mantendo os demais π -termos constantes (Tab.4.3). Para isso, o estudo foi conduzido variando-se a porosidade (ϵ) do meio poroso dentro da faixa 0,5 – 0,99 conforme descrito no capítulo III. A Tabela 4.8 apresenta os valores dos π -termos π_1 e π_6 .

Tabela 4.8 – Valores dos π –termos π_1 e π_6 .

$\pi_1 = \frac{C_{gel}}{C_0}$	$\pi_6 = \epsilon$
0,56894	0,5
0,48385	0,554444
0,41704	0,608889
0,36469	0,663333
0,32312	0,717778
0,2903	0,772222
0,26404	0,826667
0,24269	0,881111
0,22523	0,935556
0,2107	0,99

De posse dos valores de π_1 e π_6 foi realizado um ajuste de curva conforme mostrado na Fig. 4.8 obtendo-se, dessa forma, a seguinte equação componente:

$$F(\bar{\pi}_2, \bar{\pi}_3, \bar{\pi}_4, \bar{\pi}_5, \pi_6, \bar{\pi}_7) = 0,2022 \cdot (\pi_6)^{-1,465} \quad (4.14)$$

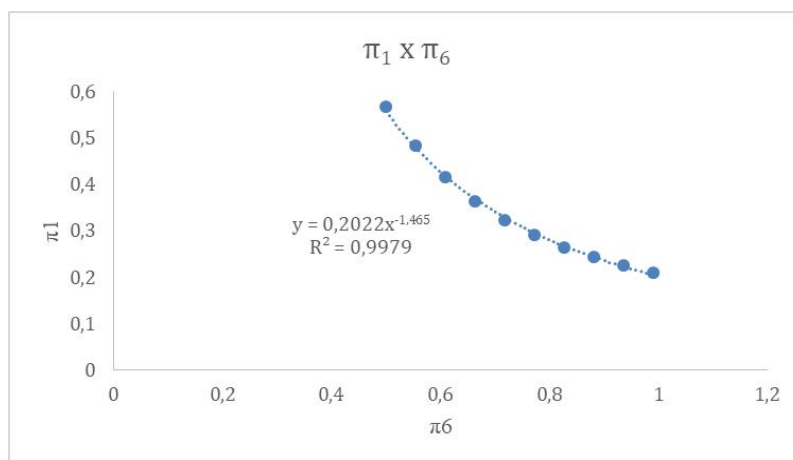


Figura 4.8 – Gráfico da função componente de π_1 em função de π_6 .

Caso 6 – $\pi_1 = F(\bar{\pi}_2, \bar{\pi}_3, \bar{\pi}_4, \bar{\pi}_5, \bar{\pi}_6, \bar{\pi}_7)$

A sétima equação componente foi obtida considerando-se a variação de π_1 e π_7 e mantendo os demais π -termos constante (Tab.4.3). Para isso, foi tomada a distância d ao longo de linha horizontal, com início na fronteira entre a câmara central e o canal A, conforme ilustrado na Fig. 4.9 com o ponto P_1 . Para determinar os π -termos π_1 e π_7 , foram obtidos os valores da concentração no interior da matriz porosa, ou seja, o primeiro ponto

foi tomado na entrada da câmara central e os demais pontos foram considerados ao longo de uma linha horizontal.

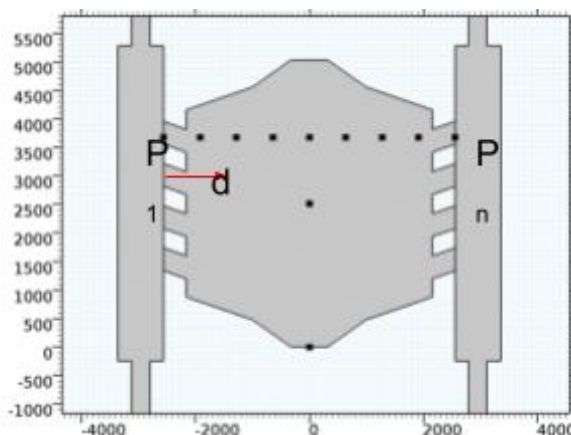


Figura 4.9 – Esquema dos pontos considerados para a obtenção da concentração no interior da matriz porosa para o cálculo dos π -termos. O ponto P_1 é considerado na fronteira da câmara central e o canal A. A variável d referente ao π_7 considera a distância medida a partir da fronteira do canal A com a câmara central para o interior da câmara, indicado pela seta vermelha.

A distância d é baseada na coordenada x_{gel} . Contudo, em função da estratégia para o desenho do modelo no *software*, foi necessário utilizar uma função para transformação. Assim, a obtenção de d a partir de x_{gel} é dada pela seguinte relação:

$$d = \left(\frac{W_{gel}}{2} \right) + x_{gel}$$

A Tabela 4.9 apresenta os valores das coordenadas dos pontos utilizados para a obtenção dos π -termos juntamente com a distância d .

Tabela 4.9 – Coordenadas x_{gel} para a obtenção de d usados na obtenção de π_7 .

x_{gel} (m)	d (m)
-0,00256	0
-0,00192	0,00064
-0,00128	0,00128
-0,00064	0,00192
0	0,00256
0,00064	0,0032
0,00128	0,00384
0,00192	0,00448
0,00256	0,00512

Com os valores da distância d foi possível determinar π_7 . A Tabela 4.10 apresenta os valores dos π -termos π_1 e π_7 .

Tabela 4.10 – Valores dos π -termos π_1 e π_7 .

$\pi_1 = \frac{C_{gel}}{C_0}$	$\pi_7 = \frac{d}{W_{gel}}$
0,99983	0
0,89975	0,125
0,73145	0,25
0,50523	0,375
0,28547	0,5
0,13476	0,625
0,056143	0,75
0,022878	0,875
0,007834	1

De posse dos valores de π_1 e π_7 foi realizado um ajuste de curva conforme mostrado na Fig. 4.10 obtendo-se, dessa forma, a seguinte equação componente:

$$F(\bar{\pi}_2, \bar{\pi}_3, \bar{\pi}_4, \bar{\pi}_5, \bar{\pi}_6, \pi_7) = 2,0037e^{-4,916\pi_7} \quad (4.15)$$

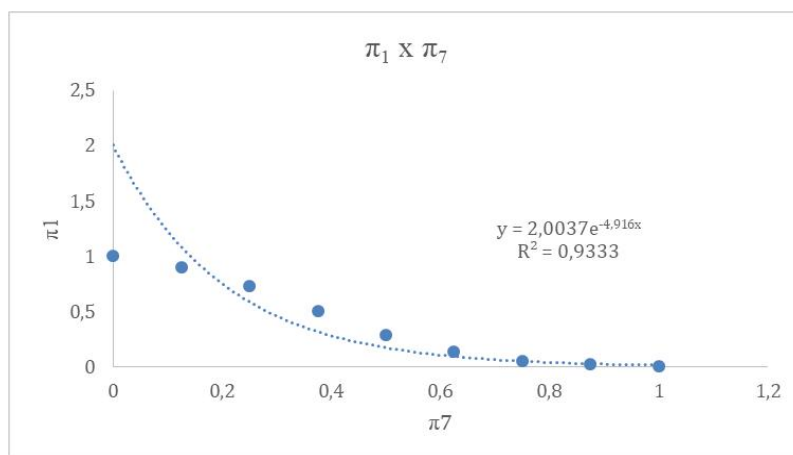


Figura 4.10 – Gráfico da função componente de π_1 em função de π_7 .

Caso 7 – $\pi_1 = F(\bar{\pi}_2, \pi_3, \bar{\pi}_4, \bar{\pi}_5, \bar{\pi}_6, \bar{\pi}_7)$

A sétima equação componente foi obtida considerando-se um novo conjunto de dados e variando π_1 e π_3 e mantendo os demais π -termos constantes. Isso foi feito com o objetivo de realizar o teste de validade e verificar se as equações componentes podem ser escritas como função produto, conforme descrito no capítulo III. Para isso, foi considerado um novo valor constante de π_2 da seguinte forma:

$$\bar{\pi}_2 = \frac{D \cdot \rho}{\mu} = \frac{1,7 \cdot 10^{-9} \times 993}{0,0006996} = 0,00243$$

O teste de validade foi realizado conforme a equação conforme Eq. (4.16).,

$$\frac{F(\bar{\pi}_2, \pi_3, \dots, \bar{\pi}_7)}{F(\pi_2, \pi_3, \dots, \pi_7)} \cong \frac{F(\bar{\pi}_2, \bar{\pi}_3, \dots, \bar{\pi}_7)}{F(\bar{\pi}_2, \bar{\pi}_3, \dots, \bar{\pi}_7)} \quad (4.16)$$

Neste caso, as duas barras denota um novo valor do π -termo constante. A obtenção desse novo valor constante de π_2 foi obtido considerando-se a difusividade do oxigênio (EHSAN; GEORGE, 2013). Analogamente ao Caso 3, o estudo foi conduzido variando a permeabilidade (κ) do meio poroso na faixa de $10^{-18} - 10^{-12} \text{ m}^2$. A Tabela 4.11 apresenta os valores de π_1 e π_3 considerando $\bar{\pi}_2$.

Tabela 4.11– Valores dos π –termos π_1 e π_3 para $\bar{\pi}_2$

$\pi_1 = \frac{C_{gel}}{C_0}$	$\pi_3 = \kappa \cdot v^{\frac{2}{3}} \left(\frac{\rho}{\mu} \right)^{\frac{4}{3}}$
0,086224	8,59157E-12
0,144394	1,43194E-06
0,224421	2,86386E-06
0,325167	4,29579E-06
0,440578	5,72772E-06
0,561332	7,15964E-06
0,676464	8,59157E-06

De posse dos valores de π_1 e π_3 , considerando-se um novo conjunto de dados para outro valor constante de π_2 denominado $\bar{\pi}_2$ foi realizado um ajuste de curva conforme mostrado na Fig. 4.11 obtendo-se, dessa forma, a seguinte equação componente

$$F(\bar{\pi}_2, \pi_3, \bar{\pi}_4, \bar{\pi}_5, \bar{\pi}_6, \bar{\pi}_7) = 0,1022e^{238687 \cdot \pi_3} \quad (4.17)$$

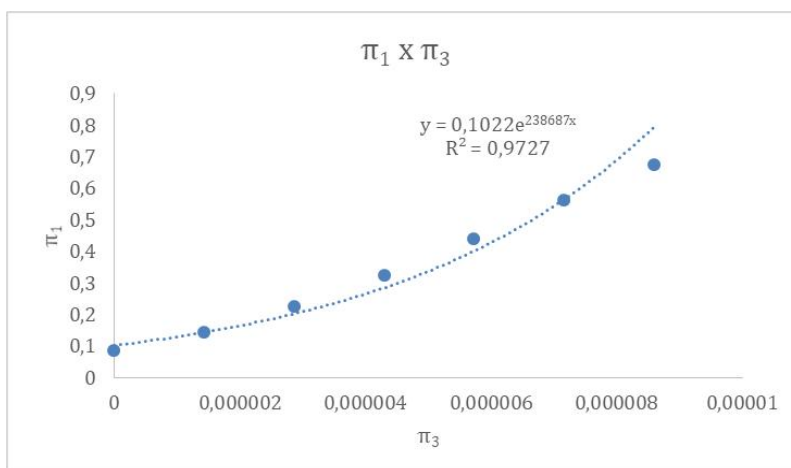


Figura 4.11 – Gráfico da função componente de π_1 em função de π_3 para um novo valor constante $\bar{\pi}_2$.

Substituindo $\bar{\pi}_3 = 8,5916 \cdot 10^{-6}$ nas Eq.(4.11) e (4.16) obtemos o termos constantes dos do teste de validade

$$F(\bar{\pi}_2, \bar{\pi}_3, \bar{\pi}_4, \bar{\pi}_5, \bar{\pi}_6, \bar{\pi}_7) = 0,7944$$

$$F(\bar{\pi}_2, \bar{\pi}_3, \bar{\pi}_4, \bar{\pi}_5, \bar{\pi}_6, \bar{\pi}_7) = 1,0226$$

Assim, substituindo os valores das equações e dos π -termos constantes no teste de validade, tem-se:

$$\frac{0,0418e^{372731\pi_3}}{0,7944} \cong \frac{0,1022e^{238687\pi_3}}{1,0226} \quad (4.18)$$

Para avaliar o erro desses ajustes, plotam-se as curvas dos dois lados da Eq.(4.18), conforme apresenta a Fig. 4.12.

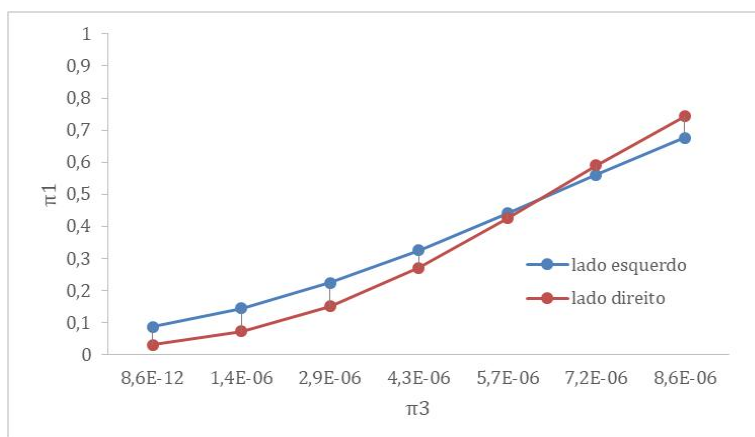


Figura 4.12 – Curvas comparativas para o teste de validade.

A diferença entre as duas curvas dadas na Fig. 4.12 é da ordem de 8 % e, portanto, considera-se que a equação preditiva pode ser obtida via função produto. Substituindo as equações componentes na Eq.(3.3) temos e substituindo os π -termos a equação preditiva pode ser escrita na forma geral como:

$$C_{gel} = 0,8235 C_0 \left(\frac{D\rho}{\mu}\right)^{0,334} \cdot e^{3727\left(\kappa v^{\frac{2}{3}}\left(\frac{\rho}{\mu}\right)^{\frac{4}{3}}\right) - 0,175\left(W_{gel} v^{\frac{1}{3}}\left(\frac{\rho}{\mu}\right)^{\frac{2}{3}}\right) - 4,916\left(\frac{d}{W_{gel}}\right) \left[W_{ch} v^{\frac{1}{3}}\left(\frac{\rho}{\mu}\right)^{\frac{2}{3}}\right]^{-2,8}} \epsilon^{-1,465} \quad (4.19)$$

4.2. Modelos matemáticos para avaliar o comportamento celular

Os modelos propostos neste trabalho estão relacionados com um tumor avascular genérico, isto é, o suprimento de nutrientes e demais substâncias importantes para as células é realizado por meio dos canais laterais do microchip e por difusão no interior da câmara central. O objetivo deste estudo foi desenvolver modelos matemáticos de evolução de células tumorais no interior de dispositivos de microfluídica, capturando heterogeneidade tumoral observada em experimentos. Para isto, foi considerado um conglomerado de células em um contínuo que se encontram em dois estados, células vivas e mortas. O modelo considera que as células interagem no dispositivo de microfluídica com as espécies químicas de glicose, O_2 e H^+ , atuando como reguladores dos processos celulares.

A seguir são apresentadas duas fases do projeto: uma inicial na qual se propõe um modelo dependente apenas da glicose e uma segunda na qual são incluídos efeitos do oxigênio e da distribuição de íons de H^+ nos dispositivos.

4.2.1. Modelo matemático para evolução celular considerando a glicose

Pesquisas acerca dos fenômenos celulares mostram que a glicose desempenha um papel importante como fonte de nutrientes para as células (SUHAIMI et al., 2015) e influencia diversos processos como a diferenciação, proliferação, migração e manutenção celular (SHAMSI, SAGHAFIAN et al., 2018, TAGHIBAKHSHI, BARISAM, et al., 2019). Outros estudos prévios indicam também que a glicose tem papel fundamental no crescimento e progressão tumoral (CASCIARI; SOTIRCHOS; SUTHERLAND, 1988, 1992; MENDOZA-JUEZ et al., 2012; ROBERTSON-TESSI et al., 2015; SHAMSI et al., 2018). Sendo assim, em um primeiro momento foi dada uma atenção especial à glicose, pois as células cancerosas podem obter ATP por meio do processo anaeróbico, isto é, obter energia mesmo para baixas concentrações de oxigênio (GATENBY et al., 2007; HEIDEN;

CANTLEY; THOMPSON, 2009; LIBERTI; LOCASALE, 2016; LIN et al., 2016; ROBERTSON-TESSI et al., 2015; SHAMSI et al., 2018; SMALLBONE; GATENBY; MAINI, 2008). Assim, o modelo inicial considerou a influência da glicose e a densidade celular para estimar o comportamento das células no interior do dispositivo de microfluídica.

É apresentado a seguir (Eq.(4.20)) o modelo que incorpora os mecanismos de proliferação e morte das células tumorais no interior do dispositivo de microfluídica em função da disponibilidade de glicose. A Eq.(4.20) baseada na lei de conservação, leva em consideração funções que contemplam a difusão, a proliferação e a morte celular.

$$\frac{\partial n(\mathbf{x},t)}{\partial t} = \nabla \cdot (D_n \nabla n) + F_p(n, G) - F_d(n, G) \quad (4.20)$$

em que $n(\mathbf{x},t)$ denota a densidade celular (células/m³); D_n representa a difusividade celular (m²/s); G representa a concentração de glicose (mol/m³);

O primeiro termo do lado direito da Eq.(4.20) representa a migração aleatória das células no interior do dispositivo a fim de ocupar toda a câmara central do dispositivo de microfluídica (o modelo considera que as células estão confinadas na câmara central). No modelo, somente é possível a motilidade celular quando o tecido circundante não estiver saturado de células, ou seja, para elevadas concentrações celulares a mobilidade celular fica restringida (STRAMER, MAYOR, 2017). Neste trabalho a difusividade das células (D_n) é considerada constante, uma vez que o período de análise foi baixo, ou seja, não ultrapassou três dias.

Os termos $F_p(n,G)$ e $F_d(n,G)$ são funções que representam a proliferação e morte celular respectivamente. Neste caso, ambas funções são dependentes da densidade celular e da concentração de nutrientes. A Equação (4.20) estabelece que a taxa de variação das células é devido à difusão celular (movimento randômico das células), e pela diferença entre as taxas de proliferação e morte das células.

De acordo com a função $F_p(n,G)$, a proliferação irá ocorrer quando a concentração de nutrientes (glicose) for maior ou igual a um dado valor crítico (G_p), caso contrário, isto é, para $G < G_p$ não ocorre a proliferação. Analogamente, a função $F_d(n,G)$ representa a necrose celular, ou seja, morte celular induzida pela falta de nutrientes que ocorre quando a concentração de nutrientes é inferior a um valor crítico (G_d). Para concentração de glicose entre G_d e G_p diz-se que a célula está no estado quiescente e não tem nem proliferação nem morte celular. Expandindo os termos da Eq.(4.20) tem-se:

$$\frac{\partial n(x,t)}{\partial t} = \nabla \cdot (D_n \nabla n) + f_p n - f_d n \quad (4.21)$$

Conforme apresentado na Eq.(4.21) as funções de proliferação e morte podem ser escritas como sendo o produto da taxa de proliferação/morte pela concentração celular, conforme apresentado pelas Eq.(4.22) e Eq.(4.23).

$$F_p = f_p \cdot n \quad (4.22)$$

$$F_d = f_d \cdot n \quad (4.23)$$

Nesta abordagem as taxas de proliferação $f_p(G)$ e morte $f_d(G)$ são assumidas como sendo delimitadas, ou seja, aumentando e diminuindo respectivamente em função da concentração de glicose com $f_p(\infty) = k_p$, $f_p(0) = 0$, $f_d(\infty) = 0$ e $f_d(0) = k_d$, onde k_p e k_d representam a máxima taxa de proliferação e morte respectivamente, baseados na literatura (IBRAHIM-HASHIM et al., 2017; TAGHIBAKHSHI et al., 2019; WARD; KING, 1997). As funções que representam as taxas de proliferação e morte em função da concentração de nutrientes são dadas pelas Eq.(4.24) e Eq.(4.25).

$$f_p = k_p \left(\frac{G^{m_1}}{G_p^{m_1} + G^{m_1}} \right) \quad (4.24)$$

$$f_d = k_d \left(1 - \frac{G^{m_2}}{G_d^{m_2} + G^{m_2}} \right) \quad (4.25)$$

em que os expoentes $m_1, m_2 > 0$ governam o perfil da curva próximo das concentrações críticas, *i.e.*, G_p e G_d . Note que em condições ótimas de nutrientes a taxa de morte é nula, ou seja, $f_d(\infty) = 0$. Isso significa que este modelo inicial não contempla a apoptose ou morte programada das células. Essas equações generalizam a cinética de Michaelis-Menten, que é frequentemente usada para modelar a cinética celular e o consumo de nutrientes em tumores (AYENSA-JIMÉNEZ et al., 2020; JARRETT et al., 2018; ROBERTSON-TESSI et al., 2015; WARD; KING, 1997). Considerando $G_p = 0,77 \text{ mol/m}^3$ e $G_d = 0,3 \text{ mol/m}^3$, estimados da literatura (WARD; J.P; KING, 1997; TAGHIBAKHSHI, BARISAM, et al., 2019) as funções degrau f_p e f_d podem ser representadas conforme Fig. 4.13. Em ambos foi considerada uma zona de transição de 0,1, que representa uma transição suave, para a

qual o *software* COMSOL® ajusta os valores de m_1 e m_2 . Os valores de G_d e G_p são apresentados na Fig. 4.13 e representam os valores médios da região de transição.

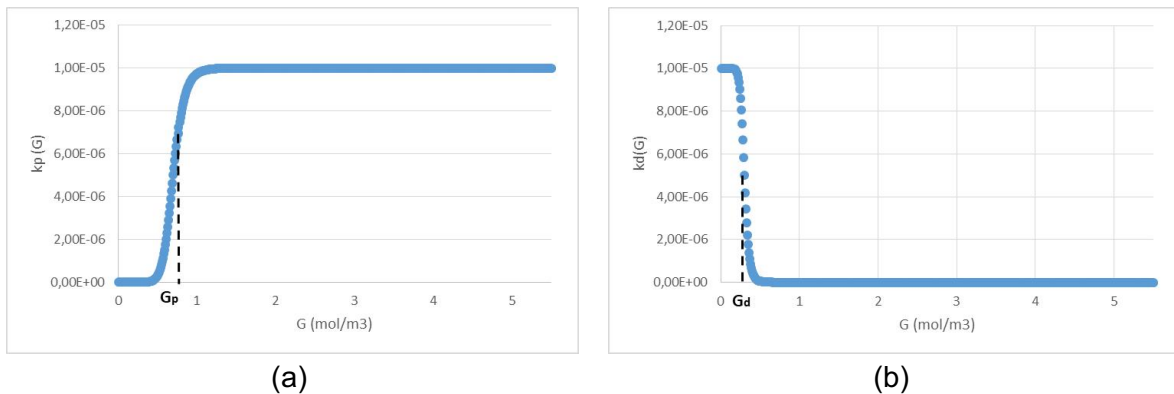


Figura 4.13 – (a) função taxa de proliferação f_p (b) função taxa de morte f_d

Assim, a Eq.(4.21) pode ser reescrita de forma geral como:

$$\frac{\partial n(x,t)}{\partial t} = \nabla \cdot (D_n \nabla n) + k_p n H_p - k_d n H_d \quad (4.26)$$

em que H_p e H_d representam as funções degrau relacionadas à proliferação e morte respectivamente. Neste caso, temos que $H_p(G > G_p) = 1$ e $H_p(G < G_p) = 0$. Analogamente temos que $H_d(G > G_d) = 0$ e $H_d(G < G_d) = 1$.

4.2.2. Modelo matemático considerando as espécies glicose, oxigênio e íons de hidrogênio e sua influência no comportamento celular

O modelo apresentado na seção 4.2.1 mostrou resultados adequados em casos em que a densidade celular é baixa, em que há renovação frequente do meio de cultura e o ambiente não apresenta restrições de dimensões que limitem a proliferação celular.

Apesar de ser um modelo representativo, estudos subsequentes indicaram a existência de outros fatores importantes que impactam no comportamento das células e que não foram considerados no primeiro modelo. Dessa forma, foi avaliada a inclusão de outros fatores no modelo matemático, que de acordo com a literatura podem influenciar no comportamento das células tumorais.

O primeiro modelo matemático contempla um termo de proliferação e um termo de morte em função da disponibilidade da glicose conforme descrito na seção anterior. No entanto, para elevadas densidades celulares e condições mais gerais algumas considerações devem ser observadas como, por exemplo, a elevada produção de H^+ , a alteração da difusão molecular no interior da matriz porosa, a geração de gradientes de oxigênio, a possibilidade de geração de núcleo necrótico entre outros. Assim, foi estudado e implementado um termo que contabiliza a morte celular em função da acidez do microambiente tumoral, um termo logístico que limita a proliferação celular no interior do dispositivo de microfluídica em função das dimensões do microchip, um termo que modula a proliferação celular em função da disponibilidade de oxigênio e um termo que contabiliza a apoptose celular. Diferentemente do modelo inicial no qual o modelo matemático não contabiliza a morte celular para concentrações acima da crítica de glicose (G_p), o modelo proposto a seguir contabiliza a morte celular devido à acidez e também morte por apoptose. Na Equação (4.27) é apresentado a evolução celular após a inclusão dos novos termos:

$$\frac{\partial n(x,t)}{\partial t} = \nabla \cdot (D_n \nabla n) + f_p n \left(1 - \frac{n}{n_{max}}\right) m_0 - f_d n - f_{dpH} n - k_{ap} n \quad (4.27)$$

A seguir é discutido separadamente cada termo da equação e os parâmetros usados no modelo, bem como os valores reportados na literatura. Foi constatado que muitos desses parâmetros são reportados dentro de amplas faixas de valores. Assim, o esforço foi na direção de identificar os valores que melhor representavam a situação de interesse, ou seja, o comportamento celular dentro de um dispositivo de microfluídica, dentro dos intervalos identificados na literatura.

4.2.2.1. Difusividade celular

O primeiro termo do lado direito da Eq.(4.27) representa o movimento randômico das células. O coeficiente de difusão celular é um parâmetro relacionado à motilidade celular aleatória para preencher todo o espaço disponível. D_n representa a motilidade celular, caracterizando a velocidade com que as células se dispersam de densidades mais altas para menores. Para matriz extracelular de colágeno, similar a cultura de hidrogel, comumente usada nos experimentos, é proposto um valor de $1 \times 10^{-9} \text{ cm}^2/\text{s}$ (TJIA, MOGHE, 2002). No entanto, existem também outros valores reportados para a difusividade celular na literatura que estão na faixa de $10^{-13} - 10^{-16} \text{ m}^2/\text{s}$ (BULL et al., 2020; KOHANDEL et al., 2007; LOLAS; CHAPLAIN, 2006; MENDOZA-JUEZ et al., 2012; RONIOTIS et al., 2010; SABIR et al., 2017; TJIA; MOGHE, 2002).

4.2.2.2. Função de Proliferação $F_p(n, G, O)$

O segundo termo do lado direito da Eq.(4.27) representa a função de proliferação celular proposto neste modelo. Na primeira abordagem foram usadas taxas de proliferação e morte em função da concentração de nutrientes. Contudo, existem limitações físicas que fazem com que as células não possam proliferar indefinidamente. Uma possibilidade de considerar este efeito é a inclusão do crescimento logístico para limitar o crescimento celular no interior do dispositivo. Este termo logístico $\left(1 - n/n_{max}\right)$ foi incluído na função de proliferação conforme pode ser observado na Eq.(4.28).

$$F_p(n, G, n_{max}) = f_p n \left(1 - \frac{n}{n_{max}}\right) \quad (4.28)$$

O crescimento populacional neste caso é limitado pela máxima densidade celular, ou seja, o crescimento populacional é baseado na razão entre a densidade de células e a capacidade máxima que limita a densidade de células permitida no interior do microchip, dependente do tamanho da célula e da quantidade de espaço disponível dentro da matriz extracelular. Neste trabalho foi estimado uma quantidade máxima de cerca de $4,5 \times 10^5$ células no interior da câmara central.

Além disso, outro fator que influencia a proliferação celular é a disponibilidade de oxigênio. A difusividade do oxigênio no interior do dispositivo assim como o consumo pelas células deverá induzir um gradiente de concentração de oxigênio. Estudos indicam que baixas concentrações de oxigênio retardam o crescimento celular e, elevadas concentrações podem ser prejudiciais para o crescimento (HU, QUARANTA, et al., 2007; MEHTA, LINDERMAN, 2006). Nesse caso, é incluído um termo na equação, denotado por m_o , que reflete a influência da concentração de O_2 sobre a proliferação celular, conforme apresentado a seguir:

$$F_p(n, G, n_{max}, O) = f_p n \left(1 - \frac{n}{n_{max}}\right) m_o \quad (4.29)$$

em que m_o indica a contribuição da concentração de oxigênio na proliferação celular dado pela Eq.(4.30):

$$m_o = \frac{k_1 \cdot O}{1 + k_2 \cdot O + k_3 \cdot O^2} \quad (4.30)$$

onde k_1 , k_2 e k_3 são parâmetros cinéticos, cujos valores reportados da literatura (HU, QUARANTA, et al., 2007; MEHTA, LINDERMAN, 2006) são $50 \text{ m}^3/\text{mol}$, $10 \text{ m}^3/\text{mol}$ e $400 \text{ m}^6/\text{mol}^2$, respectivamente, e O denota a concentração de oxigênio em mol/m^3 .

O gráfico apresentado na Fig. 4.14 ilustra a influência da concentração de O_2 na taxa de proliferação celular em que se observa uma região na qual o valor m_o aumenta de zero até um valor máximo $m_o = 1$ e em seguida uma região na qual o valor m_o diminui com o aumento da concentração de O_2 modulando, portanto, a taxa de proliferação. Para baixas concentrações de O_2 m_o tende a zero e, portanto, a taxa de proliferação celular tende a zero. À medida que a concentração de O_2 aumenta, o termo m_o aumenta até o valor máximo de 1 na qual a taxa de proliferação é máxima e em seguida m_o diminui com o aumento da concentração de O_2 até atingir um valor constante para altas concentrações de O_2 .

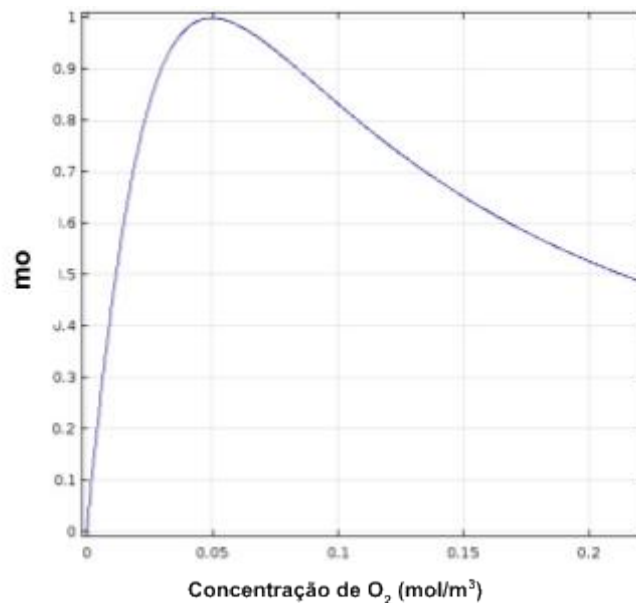


Figura 4.14 – Termo de modulação da proliferação celular em função da concentração de O_2

4.2.2.3. Função de Morte - $F_d(n, G, pH, A_p)$

Neste modelo, a função de morte celular foi desmembrada em outras três funções, considerando-se a escassez de nutrientes, acidez do microambiente tumoral e apoptose, conforme apresentado a seguir.

$$F_d(n, G, pH, A_p) = F_d(n, G) + F_{dpH}(n, pH) + F_{ap}(n) \quad (4.31)$$

em que $F_d(n, G)$ representa a necrose devido à escassez de nutrientes, $F_{dpH}(n, pH)$ representa a necrose devido à acidez do microambiente tumoral e $F_{ap}(n)$ representa a apoptose. A expansão da Eq. (4.31) é mostrada a seguir:

$$F_d(n, G, pH, Ap) = f_d n + f_{dpH} n + k_{ap} n \quad (4.32)$$

4.2.2.3.1. Morte por falta de nutrientes - $F_d(n, G)$

A morte das células tumorais é diretamente afetada pela distribuição de nutrientes no interior do dispositivo de microfluidica. Assim, em situações nas quais as células tumorais estão sujeitas à uma concentração de nutrientes abaixo da concentração crítica (G_d) por certo período de tempo, ocorre a morte celular devido à escassez de nutrientes conforme representado pela Eq.(4.27). Os valores da taxa de mortalidade celular por escassez de nutrientes são reportados na literatura em uma ampla faixa de valores $10^{-8} - 10^{-6}$ 1/s (AYENSA-JIMÉNEZ et al., 2020; CASCIARI; SOTIRCHOS; SUTHERLAND, 1992; IBRAHIM-HASHIM et al., 2017; ROBERTSON-TESSI et al., 2015; TAGHIBAKHSHI et al., 2019; WARD; KING, 1997).

4.2.2.3.2. Morte por acidez - $F_{dpH}(n, pH)$

O microambiente tumoral é hipóxico e ácido. Essas condições têm um impacto significativo na progressão do câncer bem como na resposta às terapias. Acredita-se que a hipóxia e a acidez são resultados diretos da estrutura caótica e heterogênea de tumores sólidos, e também tem sido geralmente assumido que a hipóxia e o baixo pH são fatores interdependentes (SCHOMACK, GILLIES, 2003).

Patel et al. (2001) mostram que a elevada produção de íons H^+ é favorável ao crescimento e invasão do tumor. No entanto, os autores argumentam que deve existir uma faixa ótima de densidade de microvasos que tem o papel de carrear o excesso de H^+ e manter um pH favorável ao tumor, contudo, nocivo às células normais, pois, para baixos valores de pH, isto é, microambiente muito ácido, tanto as células tumorais quanto as células normais devem morrer.

O termo de morte devido à acidez foi baseado no trabalho de Gatenby e Gawlinski (1996). Os autores propõem que a morte devido à acidez do microambiente tumoral é proporcional à concentração de H^+ , conforme Eq.(4.33):

$$d \cdot \delta H \cdot n \quad (4.33)$$

em que $d \cdot \delta H$ representa a taxa de morte dependente do excesso de concentração de ácido, d tem unidades $1/(M \cdot s)$ e seu valor é estimado na faixa de 0 a $10/(M \cdot s)$, δH representa o excesso de ácido no microambiente e n a densidade celular (GATENBY, GAWLINSKI, 1996). Neste trabalho a taxa de morte por acidez foi representada por k_{dpH} com unidades $1/s$, em que $k_{dpH} = d \cdot \delta H$

Inicialmente, a taxa de morte k_{dpH} foi avaliada para diferentes valores de d dentro da faixa reportada por Gatenby e Gawlinski (1996), conforme apresenta o gráfico da Fig. 4.15.

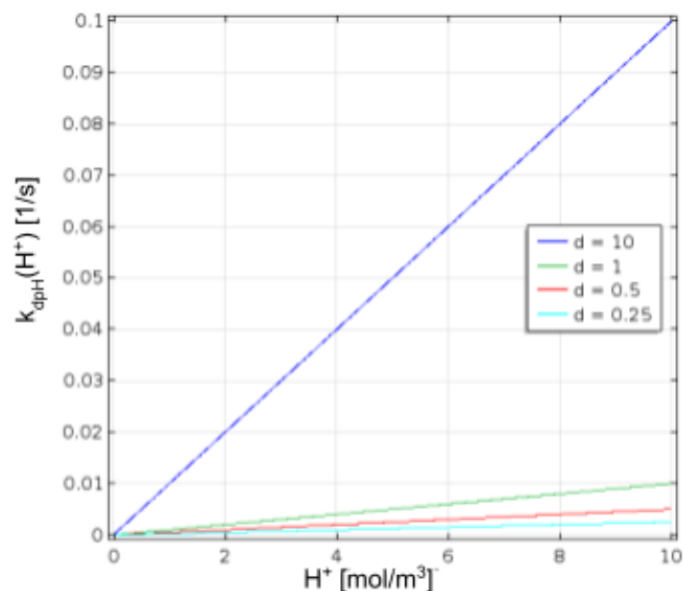


Figura 4.15 – Taxa de morte k_{dpH} em função da concentração de íons H^+ para diferentes valores de d

Observa-se que para elevados valores de d , a taxa de morte é extremamente elevada e isso não reflete o comportamento observado em células tumorais. Para o modelo utilizado neste trabalho foi considerado $d = 1/(M \cdot s)$ valor que melhor representa o comportamento de células tumorais de suportar ambientes mais ácidos em contraste com células saudáveis. Dessa forma, a função que contabiliza a morte devido à acidez do microambiente tumoral é dada pela Eq.(4.34):

$$F_{dpH} = k_{dpH} \cdot n \cdot H_{pH} \quad (4.34)$$

Nesse caso, foi incluída uma função degrau (H_{pH}), semelhante à usada para a proliferação e para a morte celular por outras causas já discutidas, com objetivo de que a função seja computada apenas para valores de $pH < pH_{crítico}$. De acordo com a literatura, as células tumorais têm sua taxa de proliferação e crescimento ótimo em ambientes com pH aproximadamente 6,7 (GATENBY, GAWLINSKI, 1996). Então, caso o pH local [$pH = -\log(H^+)$] seja inferior a um valor crítico, é contabilizada a morte celular. Baseado na literatura, em todas as simulações o valor crítico para o pH, ou seja, a resistência à acidez das células cancerosas é ajustada para $pH_{crítico} = 6$ (PATEL et al., 2001; SHAMSI et al., 2018).

4.2.2.3.3. Morte por apoptose - F_{ap} (n)

Além da necrose, há o processo natural de morte celular, denominado apoptose, na qual as células morrem naturalmente. A necrose é caracterizada por um dano na membrana e pela falta de energia, enquanto que a apoptose é o resultado de alterações genéticas na célula (KIRAN; JAYACHANDRAN; LAKSHMINARAYANAN, 2009). Taghibakhshi et al. (2019) reportam um valor constante para a taxa de morte por apoptose de $k_{ap} = 1,2153 \times 10^{-9}$ 1/s que foi considerado no modelo.

4.3. Modelo de transporte de substâncias químicas acoplado com o modelo matemático celular

Como visto no modelo proposto a proliferação e morte das células dependem da concentração de glicose, oxigênio e íons de hidrogênio. Estas substâncias são transferidas dos canais laterais de um dispositivo de microfluídica, como o usado neste trabalho (Fig. 3.1), para a câmara central, e, por conseguinte, para as células que se encontram imersas no hidrogel.

O modelo conhecido como de reação-advecção-difusão é usado para modelar o transporte dessas substâncias no interior do interstício, que corresponde à matriz de hidrogel que se encontra dentro do microdispositivo, conforme dado pela Eq.(4.1) na seção 4.1.2. Assim, considerando-se a Eq.(4.1) escrita na forma geral para descrever o transporte de uma molécula i , podemos escrever as respectivas equações que modelam a distribuição

espaço-temporal da glicose, O_2 e H^+ com os seus respectivos termos de reação, conforme dispostos a seguir:

$$\frac{\partial G(x,t)}{\partial t} + u \cdot \nabla G(x,t) = D_G \Delta G(x,t) - \omega_G n \quad (4.35)$$

$$\frac{\partial O(x,t)}{\partial t} + u \cdot \nabla O(x,t) = D_O \Delta O(x,t) - \omega_O n \quad (4.36)$$

$$\frac{\partial H(x,t)}{\partial t} + u \cdot \nabla H(x,t) = D_H \Delta H(x,t) + \omega_H n \quad (4.37)$$

em que ω_G , ω_O e ω_H representam respectivamente as taxas de consumo de glicose e oxigênio e produção de H^+ pelas células tumorais. Modelos iniciais foram simulados considerando-se ω_G constante, ou seja, foi assumido o consumo de glicose constante, conforme reporta a literatura (PATEL et al. 2001). No entanto, percebeu-se que o consumo de glicose está relacionado com o consumo de O_2 e com o fator pg que representa o efeito Warburg (SHAMSI et al. 2018).

O consumo de oxigênio é um fenômeno complexo relacionado com a fosforilação oxidativa que é um processo em que a energia obtida se dá pela degradação das moléculas provenientes dos alimentos, principalmente a glicose, e convertida em ligações nas moléculas de adenosina trifosfato (ATP). A fosforilação oxidativa consiste, portanto, da etapa final da respiração celular que ocorre na mitocôndria na presença de oxigênio, sendo, portanto, um processo aeróbio.

Vários autores consideram a taxa de consumo de oxigênio constante, independente da disponibilidade de oxigênio. No entanto, uma consideração mais realística é assumir o consumo de oxigênio descrito pelo modelo de Michaelis–Menten da cinética enzimática. Dessa forma, a taxa de consumo de oxigênio pelas células tumorais baseada na cinética de Michaelis–Menten, é escrita como:

$$\omega_O = -V_O \left(\frac{O(x,t)}{k_O + O(x,t)} \right) \quad (4.38)$$

em que V_O representa o máximo consumo de oxigênio e k_O a concentração na qual a metade do consumo máximo ocorre.

A taxa de consumo de glicose foi baseada no modelo de Shamsi et al. (2018) e Robertson-Tessi et al. (2015) que contempla o efeito Warburg computada por:

$$\omega_G = - \left(\frac{1}{2} p_G \cdot A_0 + \frac{27}{10} \omega_0 \right) \left(\frac{G(x,t)}{k_G + G(x,t)} \right) \quad (4.39)$$

em que $A_0 = 29V_0/5$ representa o patamar de produção de ATP, e k_G a concentração na qual a metade do consumo máximo ocorre. O efeito Warburg é incluído no modelo pelo fator p_G , no qual $p_G = 1$ corresponde ao consumo normal de glicose pelas células tumorais e $p_G > 1$ denota uma taxa de absorção de glicose aumentada. Além disso, o termo $(p_G \cdot A_0/2 + 27 \cdot \omega_0/10)$ inclui o efeito Pasteur, uma vez que mais glicose é consumida a taxas mais baixas de absorção de oxigênio. Com ω_0 calculado, a produção de íons H^+ é dada por $\omega_H = 29(p_G \cdot V_0 + \omega_0) \cdot k_H/5$ onde k_H é uma constante positiva menor que 1.

4.3.1. Difusividade efetiva das substâncias na presença de células

Foram feitos vários testes com o modelo descrito (não apresentados neste documento) considerando a difusividade das substâncias (glicose, O_2 e H^+) constantes conforme relatado na literatura. No entanto, percebeu-se a discordância com os resultados experimentais quando a concentração celular é elevada (acima de 10×10^6 cel/ml). A variação do coeficiente de difusão das substâncias com a concentração celular é relatado em vários trabalhos (KIHARA; ITO; MIYAKE, 2013; SUHAIMI; WARD; DAS, 2021). Ao incluir essa variação da difusividade os resultados foram mais próximos daqueles encontrados na literatura para elevadas concentrações celulares (40×10^6 cel/ml), conforme apresentado nas seções subseqüentes. A forma de correlação utilizada neste modelo está representada na Fig. 4.16, baseado na literatura (SUHAIMI; DAS, 2016; SUHAIMI; WARD; DAS, 2021). Assim, a difusividade efetiva da glicose, O_2 , H^+ são calculadas conforme expressões Eq.(4.40), Eq.(4.41) e Eq.(4.42):

$$D_{G_{eff}} = - 2 \times 10^{-17} \times n + 8 \times 10^{-10} \quad (4.40)$$

$$D_{O_2_{eff}} = - 4 \times 10^{-17} \times n + 2 \times 10^{-9} \quad (4.41)$$

$$D_{H_{eff}} = - 2 \times 10^{-17} \times n + 7 \times 10^{-10} \quad (4.42)$$

em que $D_{i_{eff}}$ denota a difusividade efetiva da molécula i (m^2/s) em função da densidade celular e n a densidade celular (cel/ml).

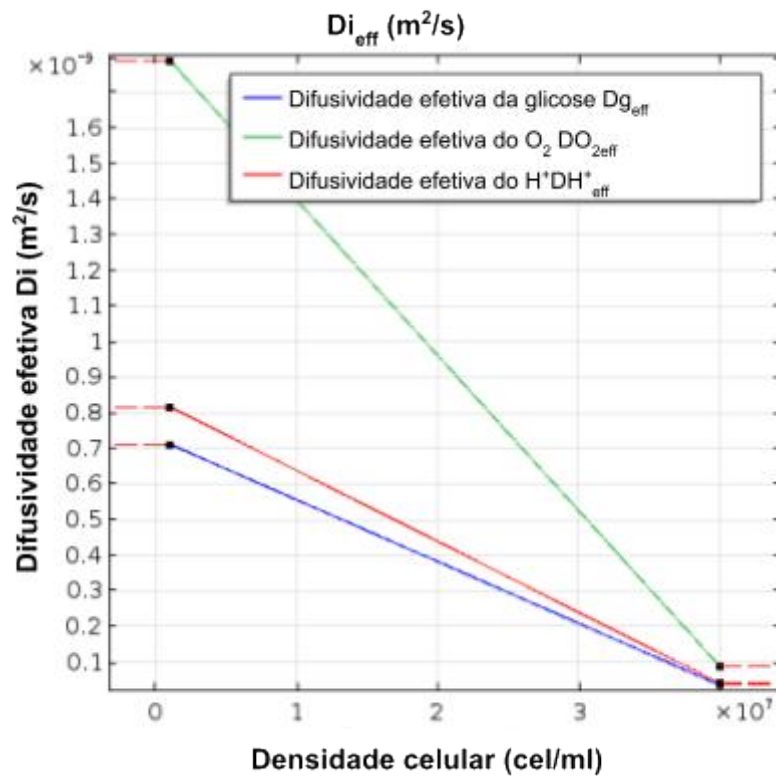


Figura 4.16 – Coeficiente de difusão efetiva em função da concentração de células no interior do dispositivo de microfluídica.

A difusão molecular é reduzida devido à obstrução das células, ou seja, as células formam uma barreira física que dificulta a mobilidade das moléculas no interstício do gel. Além disso, a literatura reporta que um fenômeno importante relacionado à contração do gel resultante da interação com as células pode ser a principal causa da diminuição da difusividade molecular (WU et al., 2005). Portanto, o aumento da densidade celular acarreta a diminuição da difusividade molecular.

Quadro 4.1 – Parâmetros usados nos modelos que consideram a dinâmica celular.

Parâmetro	Descrição	Valor	Referência
n_0	Densidade inicial de células	40×10^6 cel/ml	(CHAPLAIN; ANDERSON, 2004) (AYUSO et al., 2016)
D_n	Difusividade celular	2×10^{-14} m ² /s	(GATENBY; GAWLINSKI, 1996).
D_o	Difusividade do oxigênio	$2,5 \times 10^{-9}$ m ² /s	(ZAHORODNY-BURKE; NEARINGBURG; ELIAS, 2011) (HU; QUARANTA; LI, 2007)
D_G	Difusividade da glicose	$9,58 \times 10^{-10}$ m ² /s	(BONIFÁCIO et al., 2019; SUHAIMI et al., 2015)
D_H	Difusividade dos íons H ⁺	$1,1 \times 10^{-9}$ m ² /s	(IBRAHIM-HASHIM et al., 2017; SHAMSI et al. 2018)
O_i	Concentração inicial de oxigênio	0,22 mM = 0,22 mol/m ³	(PODICHETTY et al., 2015) (HU; QUARANTA; LI, 2007)
G_i	Concentração inicial de glicose	5,5 mM = 5,5 mol/m ³	(IBRAHIM-HASHIM et al., 2017; PATEL et al., 2001; PODICHETTY et al., 2015)
G_p	Concentração crítica de glicose para proliferação	0,77 mol/m ³	(WARD; J.P; KING, 1997) (TAGHIBAKHSHI, BARISAM, et al., 2019)
G_d	Concentração crítica de glicose para morte celular	0,3 mol/m ³	(WARD; J.P; KING, 1997)
V_o	Máximo consumo de oxigênio	$3,8 \times 10^{-16}$ mol/cel/s	(HU; QUARANTA; LI, 2007)
k_o	Concentração na qual ocorre a metade do consumo de oxigênio	0,005 mol/m ³ 0,006975 mol/m ³	(IBRAHIM-HASHIM et al., 2017) (HU; QUARANTA; LI, 2007)

k_G	Concentração na qual ocorre a metade do consumo de glicose	4×10^{-5} mol/l	(IBRAHIM-HASHIM et al., 2017; SHAMSI et al. 2018)
k_p	Taxa de proliferação celular	$9,1667 \times 10^{-6}$ s ⁻¹	(TAGHIBAKHSHI, BARISAM, et al., 2019)
k_d	Taxa de morte celular por falta de nutrientes.	$5,787 \times 10^{-8}$ s ⁻¹	(IBRAHIM-HASHIM et al., 2017)
k_{ap}	Apoptose	$1,2153 \times 10^{-9}$ s ⁻¹	(TAGHIBAKHSHI, BARISAM, et al., 2019)
k_1, k_2 e k_3	Parâmetros cinéticos da equação que modula a proliferação em função da concentração de O ₂	$k_1 = 50$ m ³ /mol $k_2 = 10$ m ³ /mol $k_3 = 400$ m ⁶ /mol ²	(HU, QUARANTA, et al., 2007; MEHTA, LINDERMAN, 2006)
n_{max}	Densidade máxima de células no interior do chip	$\cong 1,9 \times 10^{14}$ cel/m ³	

CAPÍTULO V

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com a finalidade de caracterizar os dispositivos de microfluídicas que vem sendo utilizados no campo da biologia celular e no estudo do câncer, foram desenvolvidos modelos computacionais para avaliar a distribuição de glicose, oxigênio e resíduos metabólicos (íons de H⁺) e, como esses influenciam no comportamento da proliferação e morte celular.

Na primeira parte deste capítulo são apresentados os resultados do modelo sem células para determinar o campo de concentração de nutrientes no interior do dispositivo de microfluídica. Logo após são apresentados resultados comparativos do modelo computacional com células proposto neste trabalho com resultados experimentais de diferentes configurações variando condições iniciais, valores de alguns parâmetros e geometrias que representam possíveis configurações experimentais que podem ser usadas com dispositivos de microfluídica.

5.1. Resultados obtidos usando o modelo sem célula

A fim de avaliar o padrão espaço-temporal de nutrientes no interior de um dispositivo de microfluídica, foi considerado um modelo computacional de um microdispositivo conforme descrito no capítulo IV. Nesta etapa, o propósito consistiu em caracterizar o

campo de concentração de nutrientes no interior do dispositivo e, por isso, não foi considerada a presença de células.

Neste modelo foram considerados a influência dos parâmetros físicos (pressão e velocidade do fluido intersticial); propriedades da matriz porosa em que as células ficam imersas (porosidade e permeabilidade) na distribuição de substâncias no interior do dispositivo.

5.1.1. Efeito da vazão de entrada

Para avaliar o efeito da vazão, todos os demais parâmetros foram mantidos constantes, ou seja, $\kappa = 10^{-12} \text{ m}^2$; $\epsilon = 0,8$ $D_G = 9,5823 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$; $T = 37 \text{ }^\circ\text{C}$ e, consideradas vazões q_1 , q_2 e q_3 , referentes a introdução de $10 \text{ }\mu\text{l}$, $300 \text{ }\mu\text{l}$ e 2 ml do meio de cultura na entrada dos canais laterais baseados no trabalho de Ayuso et al. (2016), conforme descrito no capítulo III. Para análise dos resultados foi tomado o valor da concentração normalizada média na primeira entrada da câmara central e, para esta análise, foi considerado um tempo de 120 s conforme apresenta a Fig. 5.1.

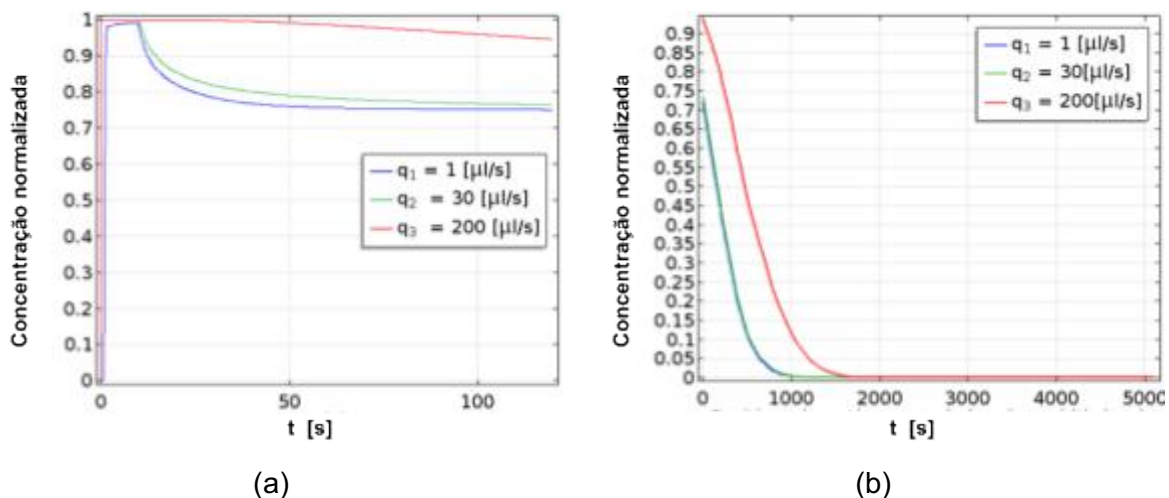


Figura 5.1 – (a) Concentração normalizada na entrada da câmara central para diferentes vazões (b) concentração ao longo da câmara central para diferentes vazões no instante $t = 120 \text{ s}$.

Uma diferença menor que 5 % na concentração foi observada quando o escoamento do fluido contendo o meio de cultura foi alterado de q_1 para q_2 (Fig. 5.1a). Essa diferença na concentração tende a diminuir com a evolução no tempo, conforme pode-se constatar na

Fig. 5.1a chegando a cerca de 1 %. Esses resultados indicam que a variação do escoamento do fluido desta magnitude, isto é, de q_1 para q_2 , que neste caso corresponde a um aumento da ordem de 30 vezes, não interfere significativamente no gradiente químico na câmara central após 120 s (Fig. 5.1b). Isso se deve ao fato da vazão ocorrer apenas nos primeiros 10 s de análise. Esse tempo de vazão considerado nos modelos é da ordem de 540 vezes menor que o tempo total de análise (5400 s) e, por consequência, sua influência nesses modelos não foi significativa. Por outro lado, em caso de volume da ordem de 2 ml a diferença de concentração é significativa e se mantém por um período de tempo maior, efeito da parcela advectiva. No entanto, essa diferença tende a reduzir com a evolução no tempo, conforme indicado na Fig. 5.1a. Esses resultados sugerem que a difusão é o principal mecanismo de transporte de massa após cessar o escoamento. Portanto, em todos os casos a concentração se torna homogênea com o tempo.

5.1.2. Efeito da variação da porosidade do hidrogel

Para analisar o efeito da variação da porosidade sobre o gradiente da glicose no *scaffold*, foram consideradas os valores de porosidades na faixa de 0,5 – 0,99, conforme descritos no capítulo III e, mantidos os demais parâmetros constantes, ou seja, $\kappa = 10^{-12} \text{ m}^2$; $\epsilon = 0,8$ $D_G = 9,5823 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$; $T = 37 \text{ }^\circ\text{C}$ e $q_1 = 1 \text{ } \mu\text{l/s}$.

A porosidade do hidrogel é um parâmetro que influencia no gradiente químico conforme apresentado na Fig. 5.2. Para todos os casos, a diferença entre as curvas de concentração, considerando-se o intervalo de porosidade proposto, tende a aumentar na entrada da câmara central (Fig. 5.2a e 5.2b). Contudo, à medida que se aproxima da região central da matriz de hidrogel, a diferença na concentração tende a diminuir.

Na Figura 5.2c é indicado que a diferença de concentração na entrada da câmara central onde está inserida a matriz de hidrogel, tende a aumentar, com a evolução do tempo, com a variação da porosidade. Os resultados mostram que o nível de concentração mais elevado está associado ao menor valor de porosidade do conjunto analisado ($\epsilon = 0,5$). Uma das razões é que uma porosidade menor, associada a uma tortuosidade maior, resulta numa maior resistência ao transporte difusivo. Conforme pode-se constatar, os níveis de concentração na entrada da câmara central são menores para $\epsilon = 0,99$, que corresponde à maior porosidade do conjunto analisado. A diferença de concentração na entrada da câmara central é cerca de 15 % entre $\epsilon = 0,5$ e $\epsilon = 0,99$ após 90 min (Fig. 5.2b). A diferença nos níveis de concentração no ponto central da matriz de hidrogel foi cerca de

2 % após 90 min (Fig. 5.2d) e, essa pequena diferença se justifica sobretudo devido ao baixo tempo de análise.

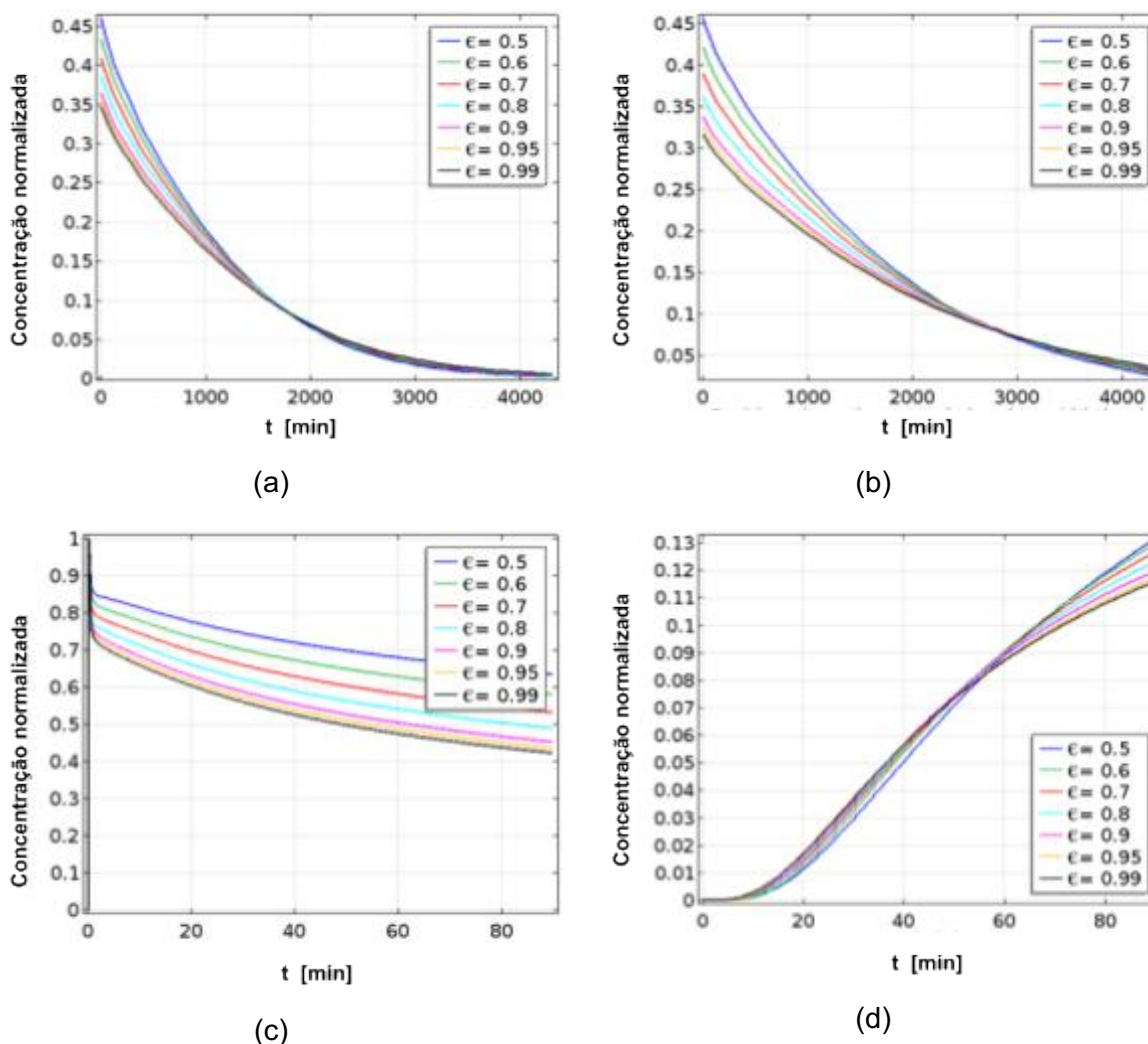


Figura 5.2 – (a) concentração normalizada de glicose ao longo da câmara central considerando um escoamento $q_1 = 1 \mu\text{l/s}$ e diferentes porosidades da matriz de hidrogel no tempo de 45 min e (b) 90 min (c) concentração normalizada de glicose na entrada da câmara central (d) concentração normalizada de glicose no ponto central da câmara central.

5.1.3. Efeito da variação da permeabilidade do hidrogel

Para avaliar a influência da permeabilidade foi considerada a faixa de $10^{-12} - 10^{-16} \text{ m}^2$, conforme reportado no capítulo III. Para efeitos de análise foram considerados apenas os gráficos referentes a porosidade de 0,5 e 0,99 conforme mostrado na Fig. 5.3, pois o comportamento do gradiente de concentração relativo ao intervalo de porosidade considerado para efeitos de análise é similar.

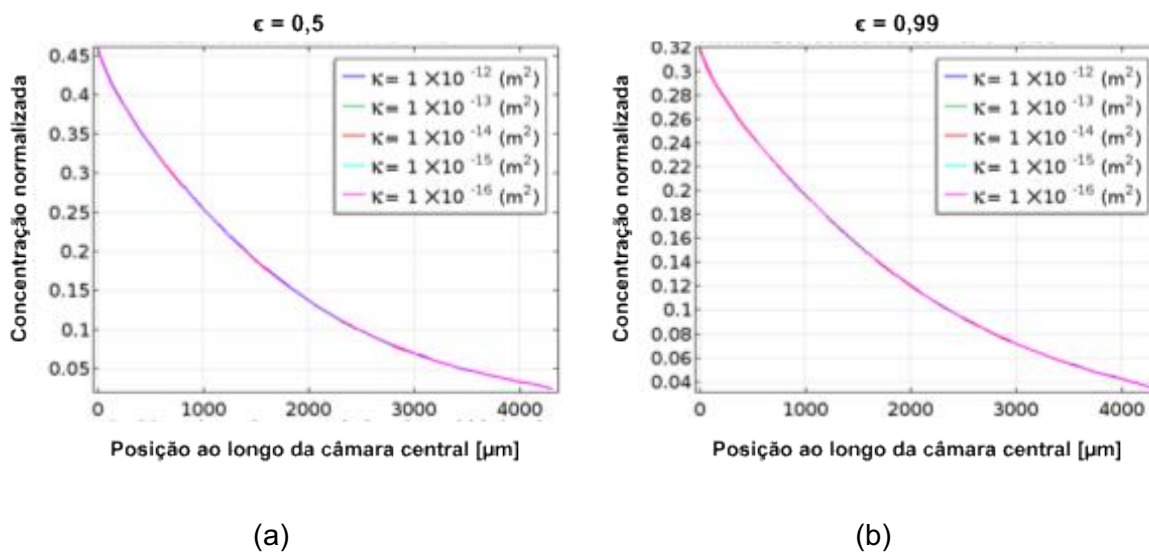


Figura 5.3 – (a) Avaliação da influência da permeabilidade na concentração de glicose ao longo da matriz de hidrogel de porosidade $\epsilon = 0,5$ e (b) $\epsilon = 0,99$.

Os resultados sugerem que, nas condições de contorno e iniciais em que os modelos foram avaliados, a permeabilidade não influencia na distribuição de glicose no interior da matriz de hidrogel (Fig. 5.3). Isso ocorre, pois o escoamento no interior da câmara central é pequeno, ou seja, o escoamento se dá principalmente nos canais laterais, devido sobretudo à resistência da matriz de hidrogel inserida na câmara central.

5.1.4. Estudo comparativo entre o hidrogel de colágeno tipo I e fibrina

Neste tópico são considerados dois tipos específicos de hidrogéis usados em estudos biológicos, empregados sobretudo em trabalhos envolvendo microfluídica. Para modelar a difusão da glicose no microchip, foram usados os hidrogéis de colágeno tipo I de densidade 2 mg/ml e fibrina, cujas propriedades foram baseadas no trabalho de Moreno-Arotzena et al. (2015). Para isso, foram abordados dois casos com diferentes condições de contorno, a fim de analisar a influência desses hidrogéis na formação do gradiente de glicose, conforme descrito no capítulo III. Em todas as análises foram considerados os termos difusivo e advectivos da Eq. (4.1). Os parâmetros usados nas análises do gradiente de concentração, bem como os valores das propriedades dos hidrogéis estão dispostos na Tab. 3.1.

a. Caso 01 – Condição de Contorno: escoamento

Para esta condição, os resultados apresentam uma pequena diferença na concentração de glicose ao longo da matriz de hidrogel no instante de 90 min conforme mostrado na Fig. 5.4. A diferença nos níveis de concentração não ultrapassa 8 % na entrada da câmara central (Fig. 5.5). Na Figura 5.6 é apresentado o campo de concentração de glicose no interior do microchip considerando-se a câmara central preenchida com hidrogel de colágeno e fibrina no tempo de 90 min.

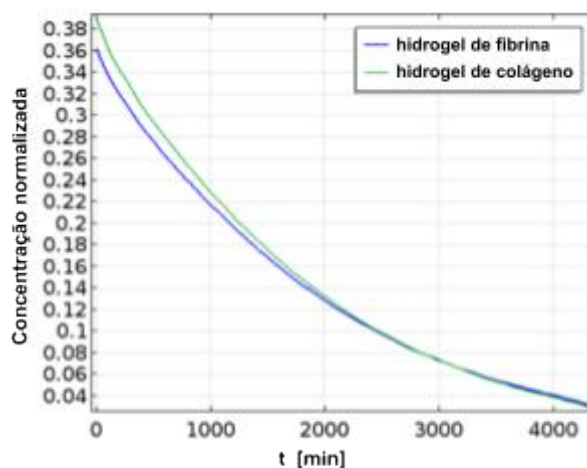


Figura 5.4 – Gráfico do gradiente de concentração ao longo da câmara central para matriz de hidrogel de colágeno e fibrina no instante de tempo $t = 90$ min.

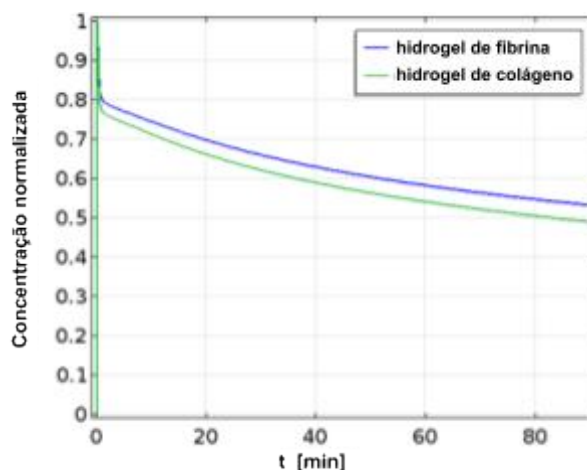


Figura 5.5 – Concentração normalizada média na primeira entrada da câmara central para hidrogel de colágeno e fibrina com o tempo.

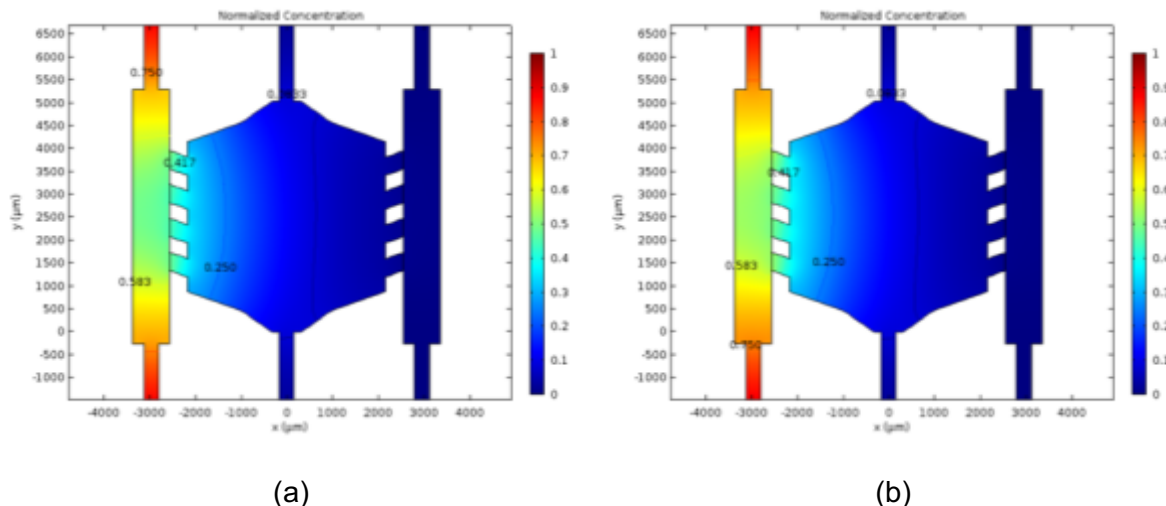


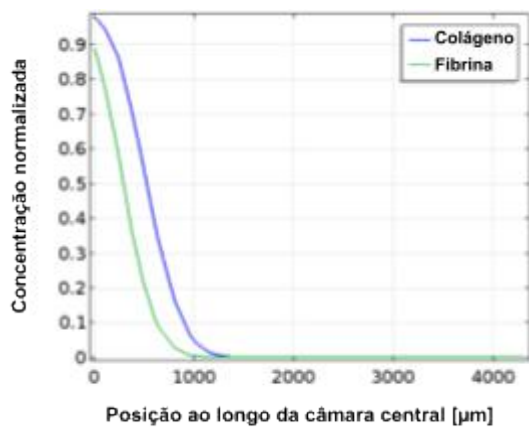
Figura 5.6 – Concentração normalizada de glicose no interior do microchip para um tempo de análise de 90 min considerando uma matriz de hidrogel de (a) colágeno (b) fibrina.

b. Caso 02 – Condição de Contorno: pressão constante

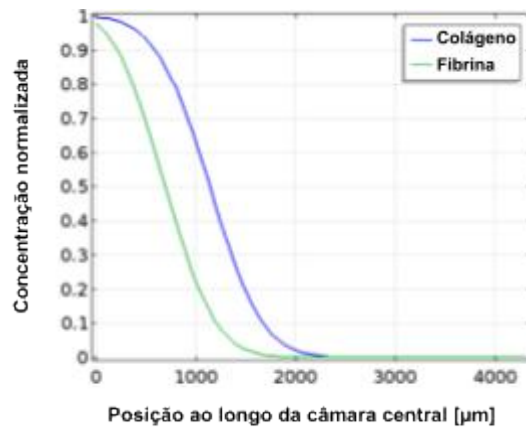
Para efeitos de comparação com a análise anterior foram considerados apenas os primeiros minutos, pois a distribuição de glicose no interior da matriz de hidrogel ocorre mais rapidamente nesta condição, isto é, com tempos da ordem de 1 % (cerca de 60 s) do tempo tomado nos modelos anteriores (~ 5400 s), os níveis de concentração de glicose na entrada da câmara central são maiores, conforme ilustrado na Fig. 5.7 que mostra a concentração normalizada de glicose no interior do microchip para diferentes instantes de tempo (60, 120, 180 e 240 s) e pressão constante de 40 Pa.

Observa-se que comparativamente aos modelos anteriores (Fig. 5.4), a distribuição de glicose no interior da matriz de hidrogel ocorre mais rapidamente nesta condição. Um aspecto interessante desses modelos é a diferença entre as curvas de concentração normalizada do colágeno e fibrina. Neste caso, o transporte advectivo é predominante e a permeabilidade passa a desempenhar um papel importante no gradiente molecular no interior do hidrogel.

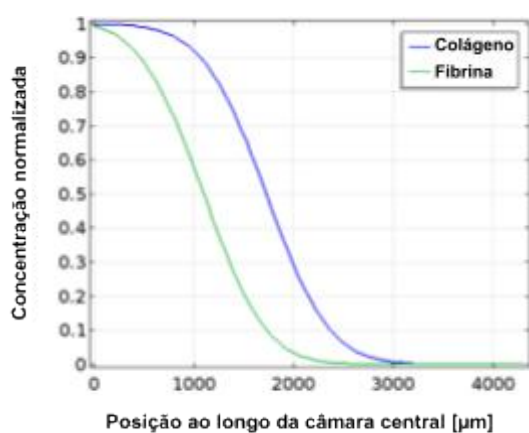
Na Figura 5.8 é apresentado o campo de concentração de glicose no interior do microchip, considerando-se as matrizes de colágeno e fibrina, para diferentes tempos de análise. O escoamento promovido pelo gradiente de pressão resulta numa velocidade média do fluido no interior da matriz de hidrogel de aproximadamente $9,4 \mu\text{m/s}$, que pode ser indesejado dependendo do experimento.



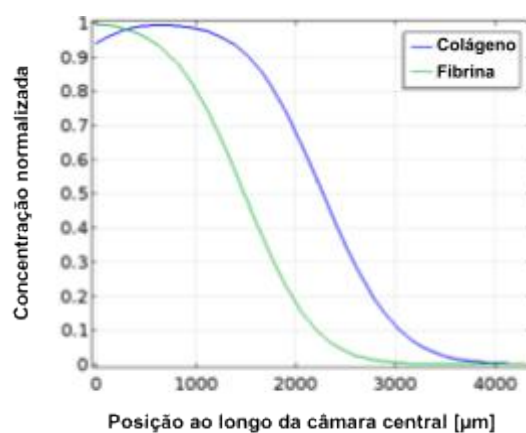
(a)



(b)

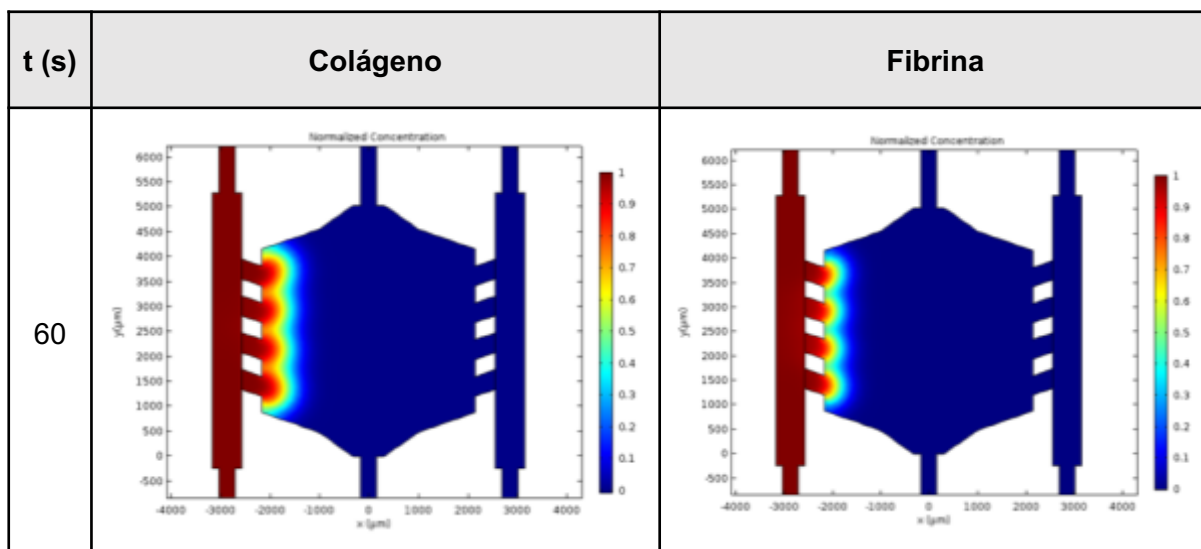


(c)



(d)

Figura 5.7 – Gradiente de concentração de glicose ao longo da câmara central para matriz de hidrogel de colágeno e fibrina considerando-se a condição de pressão constante nas extremidades do canal A para os tempos de (a) 60 s (b) 120 s (c) 180 s (d) 240 s.



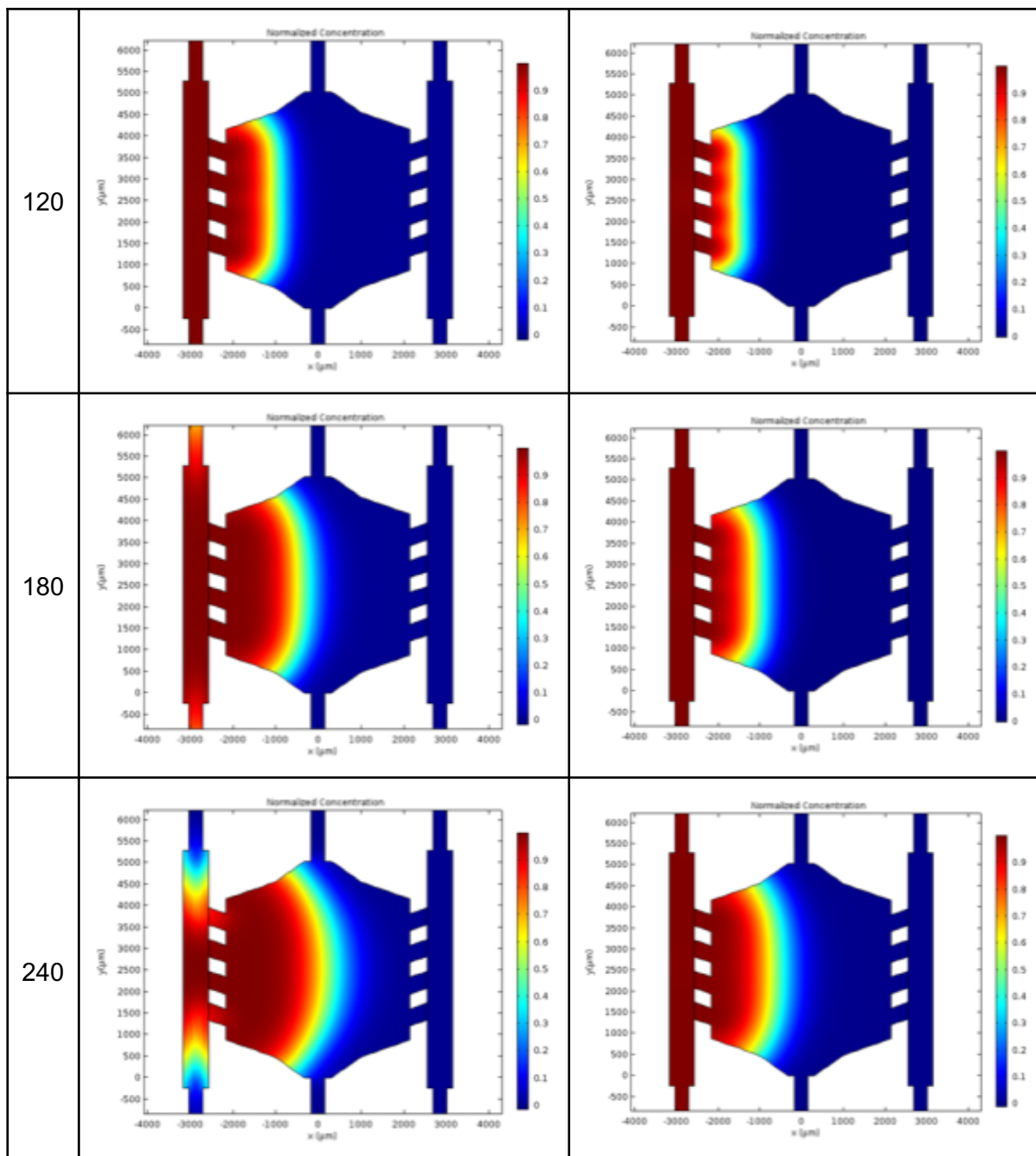


Figura 5.8 – Comparação da gradiente de glicose no interior da câmara central para os hidrogéis de colágeno e fibrina considerando-se diferentes tempos de análise.

5.1.5. Equação preditiva para estimar o campo de concentração de substâncias no microchip

Para avaliar a influência da combinação de vários parâmetros na distribuição espaço-temporal no interior do microchip foram utilizadas técnicas de similitude em engenharia para obter um modelo de predição do fenômeno considerando variações controladas para as variáveis de influência, conforme descrito nos capítulos III e IV.

Para avaliar a concentração via equação preditiva e comparar com os resultados obtidos usando o método dos elementos finitos foram variados os parâmetros: difusividade; distância no interior da matriz porosa; porosidade e permeabilidade, conforme descrito no capítulo III. As Tabelas 5.1 – 5.4 apresentam os valores da concentração obtidos via MEF e calculados pela equação preditiva com o respectivo erro percentual. As Figuras 5.9 – 5.12 apresentam os resultados da concentração obtida via MEF e equação preditiva.

Tabela 5.1 – Concentração obtidos via MEF e equação preditiva em função de D.

D	C_{MEF}	$C_{Similitude}$	Erro (%)
1E-12	0,035133	0,03301	6,0
1,44E-10	0,15325	0,17321	13,0
2,86E-10	0,22605	0,21804	3,5
4,29E-10	0,26802	0,24953	6,9
5,72E-10	0,29526	0,27462	7,0
7,15E-10	0,31406	0,29581	5,8
8,57E-10	0,32788	0,31434	4,1
1E-09	0,33865	0,33092	2,3

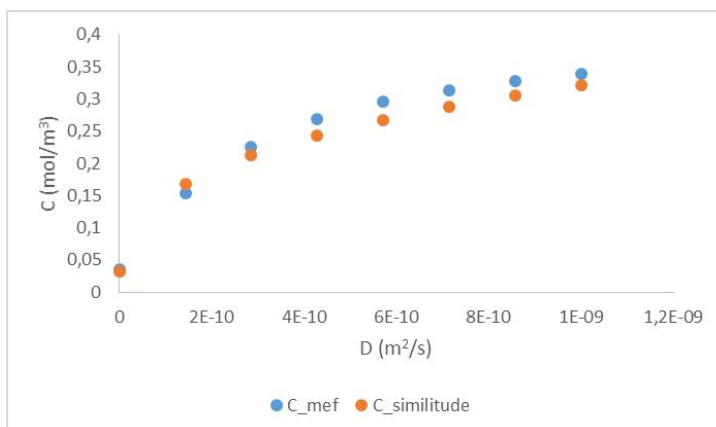


Figura 5.9 – Concentração versus Difusividade via MEF e similitude.

Tabela 5.2 – Concentração obtidos via MEF e equação preditiva em função de d.

d (m)	C_{MEF}	$C_{Similitude}$	Erro (%)
0	0,99983	1,1330	13,3
0,00064	0,89975	0,6128	31,9
0,00128	0,73145	0,3315	54,7
0,00256	0,28547	0,0970	66,0
0,0032	0,13476	0,0525	61,1
0,00384	0,056143	0,0284	49,5
0,00448	0,022878	0,0153	32,9
0,00512	0,007834	0,0083	6,0

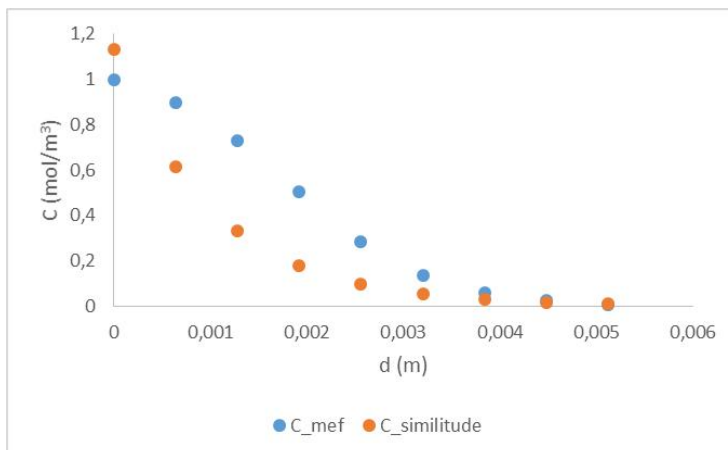


Figura 5.10 – Concentração versus distância no interior da câmara central via MEF e similitude.

Tabela 5.3 – Concentração obtidos via MEF e equação preditiva em função da porosidade.

ϵ	C_{MEF}	$C_{Similitude}$	Erro (%)
0,5	0,5689	0,52662	7,44
0,554444	0,4839	0,45262	6,45
0,608889	0,4170	0,39458	5,39
0,663333	0,3647	0,34805	4,56
0,717778	0,3231	0,31007	4,04
0,772222	0,2903	0,27858	4,04
0,826667	0,2640	0,25211	4,52
0,881111	0,2427	0,22962	5,38
0,935556	0,2252	0,21031	6,62
0,99	0,2107	0,19359	8,12

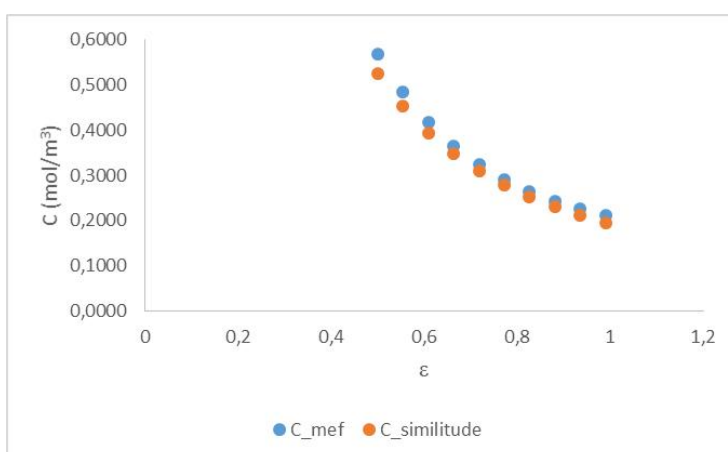


Figura 5.11 – Concentração versus porosidade via MEF e similitude.

Tabela 5.4 – Concentração obtidos via MEF e equação preditiva em função permeabilidade.

κ	C_{MEF}	$C_{Similitude}$	Erro (%)
1E-18	0,029422	0,03944299	34,06
1,67E-13	0,072329	0,067260959	7,01
3,33E-13	0,15054	0,114698117	23,81
5E-13	0,27123	0,195591292	27,89
6,67E-13	0,42597	0,333536023	21,70
8,33E-13	0,59325	0,568769075	4,13
1E-12	0,7451	0,969905015	30,17

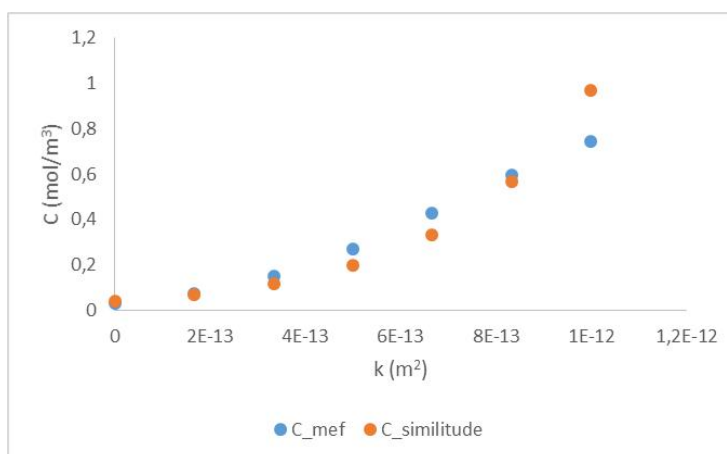


Figura 5.12 – Concentração versus permeabilidade via MEF e similitude.

5.2. Discussão do modelo sem célula

Nesta etapa do trabalho foi avaliada, por meio de uma abordagem *in silico*, o campo de concentração de nutrientes em um hidrogel imerso em um dispositivo de microfluídica empregado em análises biológicas. O estudo foi conduzido, visando entender a influência de alguns parâmetros no transporte de nutrientes, como a glicose, sobre materiais usados em experimentos com cultura de células. Inicialmente, considerou-se diferentes vazões nos canais laterais do microdispositivo bem como diferentes porosidades e permeabilidades do *scaffold* na faixa comumente encontrada em trabalhos experimentais. Na segunda etapa, o estudo da distribuição espaço-temporal da glicose foi conduzida considerando-se dois hidrogéis frequentemente usados em experimentos biológicos. Em seguida foi desenvolvido um modelo matemático via técnicas de similitude para avaliar a distribuição espaço-temporal de substâncias no interior do chip em função dos parâmetros de influência do fenômeno.

5.2.1. Limitações do modelo

- Presença de células

Destaca-se que as simulações realizadas nesta etapa não consideraram a presença de células. Em uma cultura em dispositivo de microfluídica, as células podem consumir ou produzir rejeitos, modificando, portanto, a distribuição espaço-temporal das substâncias, algo que não se observa em um modelo sem células. Da mesma maneira, a célula também pode interagir e modificar a matriz extracelular. Ademais pode ocorrer a interação das moléculas com o meio poroso, contudo, a interação da glicose com os hidrogéis de colágeno e fibrina é baixa e, portanto, não foi considerada nos modelos propostos.

5.2.2. Parâmetros importantes

- Efeito do escoamento - q

A distribuição espaço-temporal de glicose no interior da câmara central após 90 min de análise não é influenciada de forma significativa pela variação da vazão inicial à qual é depositada o meio de cultura. No entanto, durante o período de introdução do meio de cultura nos canais laterais, observou-se uma pequena variação no gradiente de concentração de glicose na entrada da câmara central bem como no interior da matriz. Contudo, essa diferença tende a diminuir com a evolução do tempo. A principal razão para isto é o fato de que o mecanismo de transporte de massa predominante após cessar o escoamento do meio de cultura é a difusão. Associado a isso, temos que os canais não são alimentados com meio de cultura após cessar o escoamento que, por consequência, reduz a concentração nos canais laterais.

- Efeito da porosidade - ϵ

A diminuição da porosidade ϵ , conseqüentemente o aumento da tortuosidade, tem um efeito relevante na redução efetiva da difusão mássica, ou seja, a resistência ao transporte de massa por difusão é, portanto, mais significativo. Essa resistência à difusão é observada pelo gradiente de concentração de glicose no interior da câmara central na qual os níveis de concentração são maiores para as matrizes com menores valores de porosidade. Esse efeito de transporte é evidenciado pela Eq. (4.5), na qual verifica-se que quando a porosidade tende a 1, ou seja, meio livre, a difusividade efetiva tende a

difusividade no meio livre. Além disso, uma matriz com uma porosidade elevada associada a poros maiores e, conseqüentemente menor tortuosidade, permite que as moléculas, como neste caso de glicose, se difundam com mais facilidade no meio. Estudos mostram evidências em concordância de que a difusividade efetiva da glicose aumenta com o tamanho dos poros e, portanto, a diminuição da tortuosidade. No entanto, essa tendência não é linear para materiais diferentes destacando, portanto, a morfologia dos poros (SUHAIMI et al., 2015).

- Efeito da permeabilidade - κ

O perfil de concentração ao longo da câmara central não foi alterado significativamente em função da permeabilidade. No trabalho de Ayuso et al. (2016), os autores injetaram 10 μl de meio de cultura nos canais laterais e observaram que o escoamento foi praticamente paralelo à câmara central e, para 300 μl os autores observaram um pequeno escoamento através do hidrogel, como foi observado também no presente estudo. Os autores apontam que um dos motivos para isso é a elevada resistência do hidrogel confinado na câmara central. Isso reforça que, nas situações estudadas, o principal mecanismo de transporte de substância no interior do *scaffold* é a difusão. A parcela advectiva neste caso é desprezível, uma vez que o escoamento é considerado apenas no período inicial da análise e, portanto, a influência da permeabilidade no gradiente de concentração não é significativa.

5.2.3. Estudo comparativo hidrogel de fibrina e colágeno

O estudo comparativo entre os hidrogéis de colágeno e fibrina foram conduzidos por meio de duas abordagens diferentes, isto é, considerando-se condições de contorno distintas, conforme descrito no capítulo III.

i. Caso 01 – condição de contorno: escoamento

No caso 01, verifica-se que os hidrogéis apresentaram resultados similares do ponto de vista de distribuição de glicose. A pequena diferença de concentração, da ordem de 2 %, foi observada ao longo da câmara central por um tempo de 90 min, indicando que o hidrogel de fibrina apresenta uma resistência ao transporte de massa ligeiramente maior que o hidrogel de colágeno. Nas condições deste estudo, atribui-se à porosidade a diferença no gradiente químico no interior da matriz porosa.

ii. Caso 02 – condição de contorno: pressão constante

No caso 02, em que as condições de contorno foram gradiente de pressão no microchip, o efeito da permeabilidade foi o parâmetro mais significativo. Nessa situação, na qual o gradiente de pressão promove o escoamento do fluido através da matriz de hidrogel e, portanto, a parcela advectiva não é desprezível, a permeabilidade configura como a variável mais influente na formação do gradiente de glicose. A permeabilidade é dependente de uma combinação de vários fatores como tamanho dos poros, porosidade, disposição das fibras na matriz, arquitetura e composição da matriz (GERMAN; MADIHALLY, 2016; SWARTZ; FLEURY, 2007). Assim, o experimento que envolve o escoamento através do hidrogel deverá levar em consideração a influência da permeabilidade na formação do gradiente químico. É importante ressaltar que a escolha do hidrogel a ser utilizado deverá ser pautada pelo tipo de estudo que se deseja realizar, pois outras propriedades devem ser levadas em consideração como, por exemplo, a rigidez da matriz, densidade do hidrogel dentre outras (MORENO-AROTZENA et al., 2015; SWARTZ; FLEURY, 2007).

5.2.4. Modelo matemático via similitude

As curvas obtidas via equação preditiva mostram boa concordância com aquelas obtidas através do método dos elementos finitos. Apesar de se tratar de um modelo preliminar, a similitude se apresenta como uma ferramenta eficiente para estudar fenômenos complexos que envolvem a interação de várias variáveis, conforme o problema proposto neste trabalho. Como uma abordagem inicial para compreender os fenômenos relacionados à distribuição espaço-temporal de substância no interior de um dispositivo de microfluídica, os resultados obtidos por meio da equação preditiva apresentam uma boa correlação com os resultados obtidos via MEF. É importante ressaltar que a equação preditiva não permite a análise de resultados obtidos via extrapolação, ou seja, as análises devem ser conduzidas considerando-se os intervalos dos parâmetros apresentados. Contudo, o modelo de similitude desenvolvido pode contribuir para auxiliar no ajuste experimental, com uma estimativa do campo de concentração de determinada substância, dentro das faixas estudadas, bem como auxiliar na fabricação de dispositivos de microfluídica similares.

5.3. Comparação do modelo proposto com resultados experimentais

A fim de avaliar a representatividade dos modelos propostos foram realizadas comparações com modelos experimentais reportados na literatura. Inicialmente, é descrita a comparação do modelo computacional sem célula, ou seja, sem a inclusão dos modelos matemáticos desenvolvidos para simular o comportamento celular e, em seguida, é discorrido a respeito da comparação entre o modelo com célula e modelos experimentais com células tumorais avaliando a viabilidade, mortalidade, proliferação celular e formação do núcleo necrótico.

5.3.1 Comparação com modelo sem células

O trabalho experimental considerado para fins de análise foi desenvolvido por Ayuso et al. (2016). Neste trabalho, os autores estudaram, dentre outros, o gradiente de concentração de glicose e oxigênio em um dispositivo de microfluídica usado para mimetizar um microambiente tumoral. Os autores utilizaram o NBDG análogo de glicose fluorescente, que foi perfundido através de um dos canais laterais. Eles analisaram a distribuição do NBDG através do hidrogel de colágeno após 90 min e perceberam que a diferença na intensidade da fluorescência entre os canais era de cerca de 30 %, conforme pode-se observar na Fig 5.13.

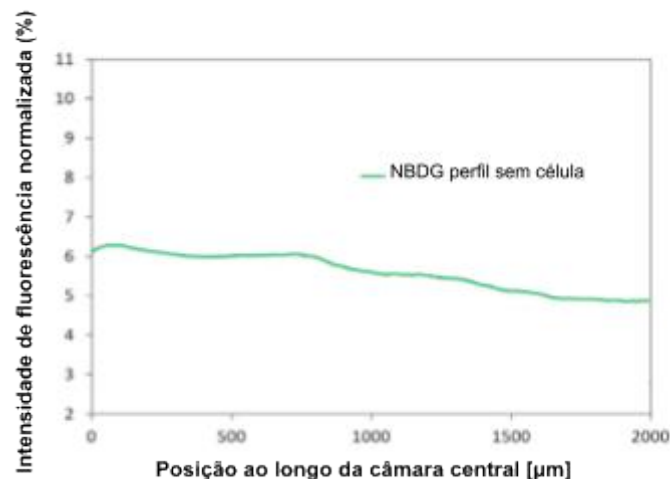


Figura 5.13 – Intensidade de fluorescência normalizada em função da posição ao longo da câmara central (Adaptado de AYUSO et al., 2016).

Utilizando o modelo computacional desenvolvido, foi avaliado o gradiente de glicose através do hidrogel de colágeno, cujas propriedades de porosidade e permeabilidade estão dispostas na Tab.3.1, após 90 min. Foi considerado que o transporte de glicose se dá do microcanal lateral para a câmara central. A formação do gradiente de glicose no interior da câmara central foi analisada. Na Figura 5.14 é apresentada a concentração através do hidrogel obtido computacionalmente. Observa-se que a diferença entre o microcanal em que a glicose foi perfundida e o microcanal do lado oposto é de cerca de 30 %. A curva obtida utilizando o modelo computacional apresenta um gradiente de concentração de glicose aproximadamente igual ao gradiente reportado experimentalmente por Ayuso e colaboradores.

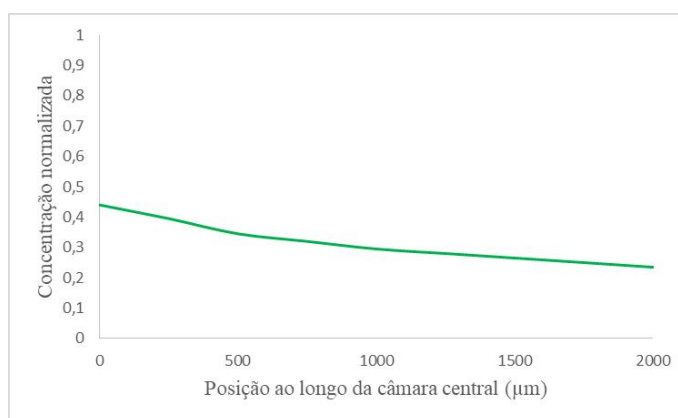


Figura 5.14 – Concentração normalizada de glicose ao longo da câmara central após 90 min.

Um segundo modelo foi implementado para reproduzir um experimento citado por Córdor et al. (2018) com um dispositivo similar ao utilizado neste trabalho. Os autores avaliaram o campo de concentração no interior do microchip com diferentes configurações. Eles simularam, dentre outros, o gradiente de concentração do PDGF-BB no hidrogel de colágeno após 24 h, e a validação do modelo numérico foi baseada em trabalho experimental publicado anteriormente. Para comparar os resultados obtidos com este segundo modelo, realizou-se uma simulação da difusão do PDGF-BB, introduzida através do microcanal lateral, e analisou o gradiente através do hidrogel de colágeno (localizado na câmara central).

Considerou-se coeficiente de difusão do PDGF-BB de $1.26 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$ e coeficiente de difusividade efetivo do PDGF-BB em colágeno de $0.77 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$, conforme reportado na literatura (CÓNDOR et al. 2018). Para analisar os resultados, foi desenvolvida a

geometria baseada no chip-1 utilizado por Córdor e colaboradores, semelhante à geometria utilizada neste trabalho.

Na Figura 5.15a é apresentada a malha de elementos finitos utilizada por Córdor et al. (2018) e a Fig. 5.15b malha utilizada do modelo proposto implementado. Na Figura 5.16 é mostrada a distribuição espaço-temporal de PDGF-BB no hidrogel de colágeno obtido computacionalmente após 24 h.

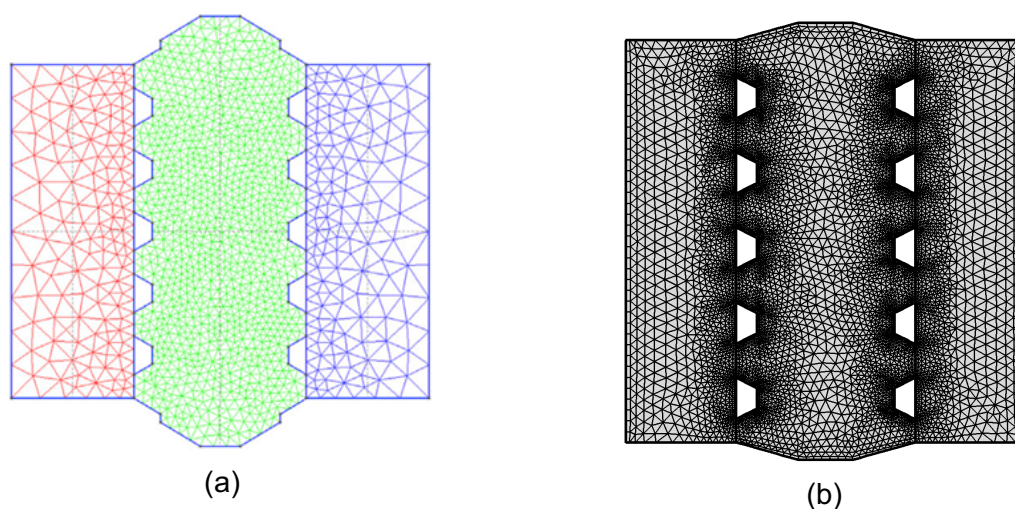


Figura 5.15 – Modelo de elementos finitos do dispositivo de microfluídica. (a) malha da geometria do chip-1 desenvolvido por Córdor e colaboradores . (b) malha da geometria do chip do dispositivo utilizado usado neste trabalho para comparação dos resultados.

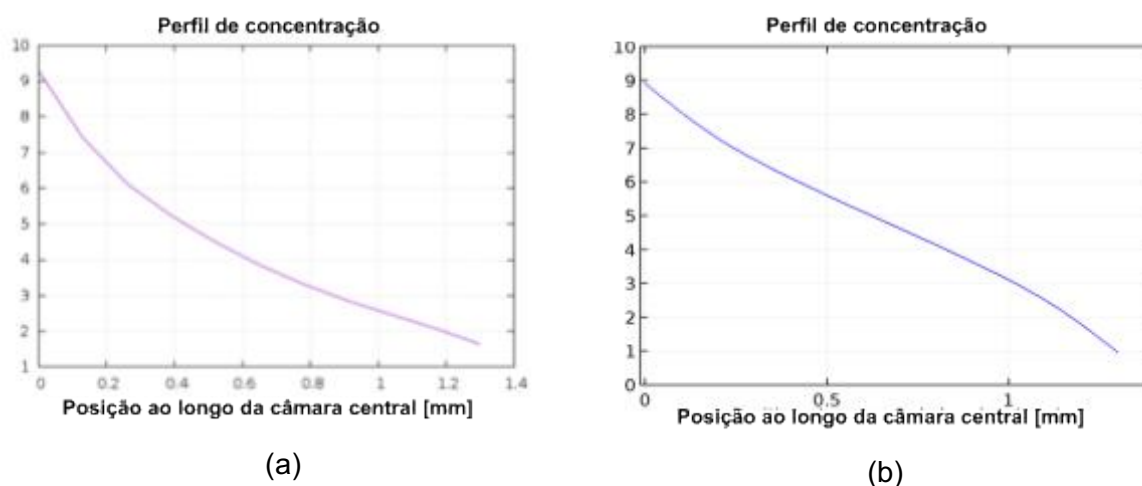


Figura 5.16 – Concentração do PDGF-BB ao longo da câmara central (a) obtido por Córdor e colaboradores (Adaptado de CÓNDROR et al., 2018) (b) obtidos pelo modelo computacional proposto.

Observa-se uma diferença de concentração de aproximadamente 70 % entre microcanais laterais, este resultado está de acordo com o reportado por Córdor e colaboradores, conforme mostrado na Fig. 5.16. O gradiente de concentração do PDGF-BB obtido por Córdor e colaboradores (Fig. 5.16a) foi similar ao gradiente apresentado pelo modelo proposto (Fig. 5.16b).

5.3.2. Comparação com modelo com células

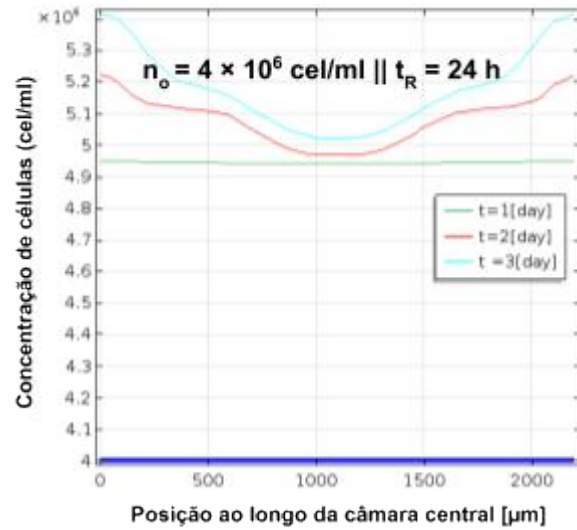
i. Formação do núcleo necrótico

Ayuso et al. (2016) avaliaram em seu trabalho a formação do núcleo necrótico, que é típico de um microambiente tumoral *in vivo*, considerando diferentes concentrações iniciais de células durante um período de três dias. Os autores observaram que a formação do núcleo necrótico ocorreu principalmente para os casos em que a densidade inicial de células foi elevada, ou seja, $n_0 = 40 \times 10^6$ células/ml.

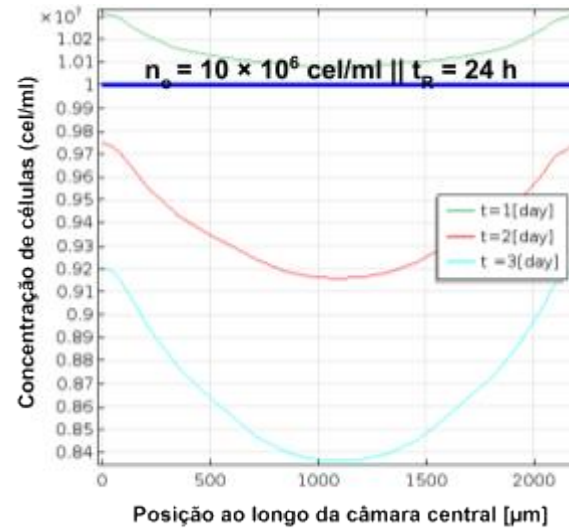
Para efeitos de comparação foi realizado um estudo, baseado no trabalho conduzido por Ayuso et al. (2016), visando avaliar a representatividade do modelo proposto, em que foram consideradas três condições de densidade inicial de células no interior do dispositivo, isto é, $n_0 = 4 \times 10^6$; 10×10^6 ; 40×10^6 cel/ml. O modelo foi avaliado considerando-se um período de três dias e renovação do meio de cultura a cada 24 h. Na Figura 5.17 é apresentada a evolução da densidade de células no interior da câmara central após três dias, levando-se em conta essas diferentes concentrações iniciais de células.

Conforme apresentado na Fig. 5.17, pode-se observar que a formação do núcleo necrótico é acentuada para a máxima concentração inicial de células ($n_0 = 40 \times 10^6$ cel/ml). Após o terceiro dia, cerca de 70 % das células no interior da câmara central estão mortas que corroboram com os resultados obtidos por Ayuso e colaboradores. A presença do núcleo necrótico após o terceiro dia foi observada apenas para o experimento conduzido com a máxima densidade inicial de células em conformidade com Ayuso et al. (2016).

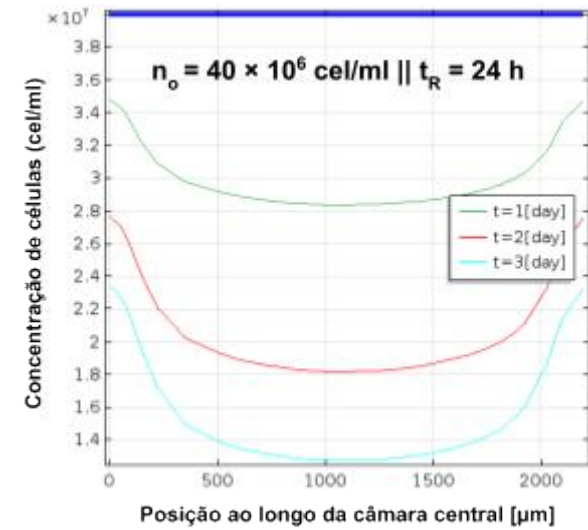
No modelo proposto pode-se observar o início da formação do núcleo necrótico para a concentração $n_0 = 10 \times 10^6$ cel/ml, na qual verifica-se cerca de 15 % de células mortas após três dias. Já para o modelo cuja concentração inicial é de $n_0 = 4 \times 10^6$ cel/ml não se observa a formação do núcleo necrótico (Fig. 5.17). Esses resultados estão de acordo com os apresentados por Ayuso e colaboradores. A comparação entre os resultados experimentais e os obtidos aqui usando os modelos computacionais mostram uma boa concordância.



(a)



(b)



(c)

Figura 5.17 - Densidade celular no interior do dispositivo de microfluídica para três dias de simulação. (a) $n_o = 4 \times 10^6$ cel/ml (b) $n_o = 10 \times 10^6$ cel/ml (c) $n_o = 40 \times 10^6$ células/ml). A linha azul indica a concentração inicial de células em cada caso.

ii. Formação do núcleo necrótico para células tumorais U-251 MG e HCT-116

Após avaliar que a formação do núcleo necrótico se dá com a máxima densidade de células usadas no experimento, *i.e.*, 40×10^6 cel/ml, Ayuso e colaboradores estudaram a dinâmica da formação do núcleo necrótico de duas linhagens de células tumorais, U-251 MG e HCT-116 em diferentes dias (Fig. 5.18). A viabilidade celular foi avaliada usando calceína marcando as células viáveis de verde e iodeto de propídeo na identificação da morte celular marcando de vermelho. Os autores mencionam que para o experimento utilizando células U-251 MG a formação do núcleo necrótico dá-se até o terceiro dia com o sistema se estabilizando, ou seja, a espessura das células viáveis e mortas não variaram após o terceiro dia. Para os experimentos conduzidos com as células HCT-116, os autores reportam a formação do núcleo necrótico já no primeiro dia de análise sendo significativamente mais rápida do que as células U-251 MG (Fig. 5.18).

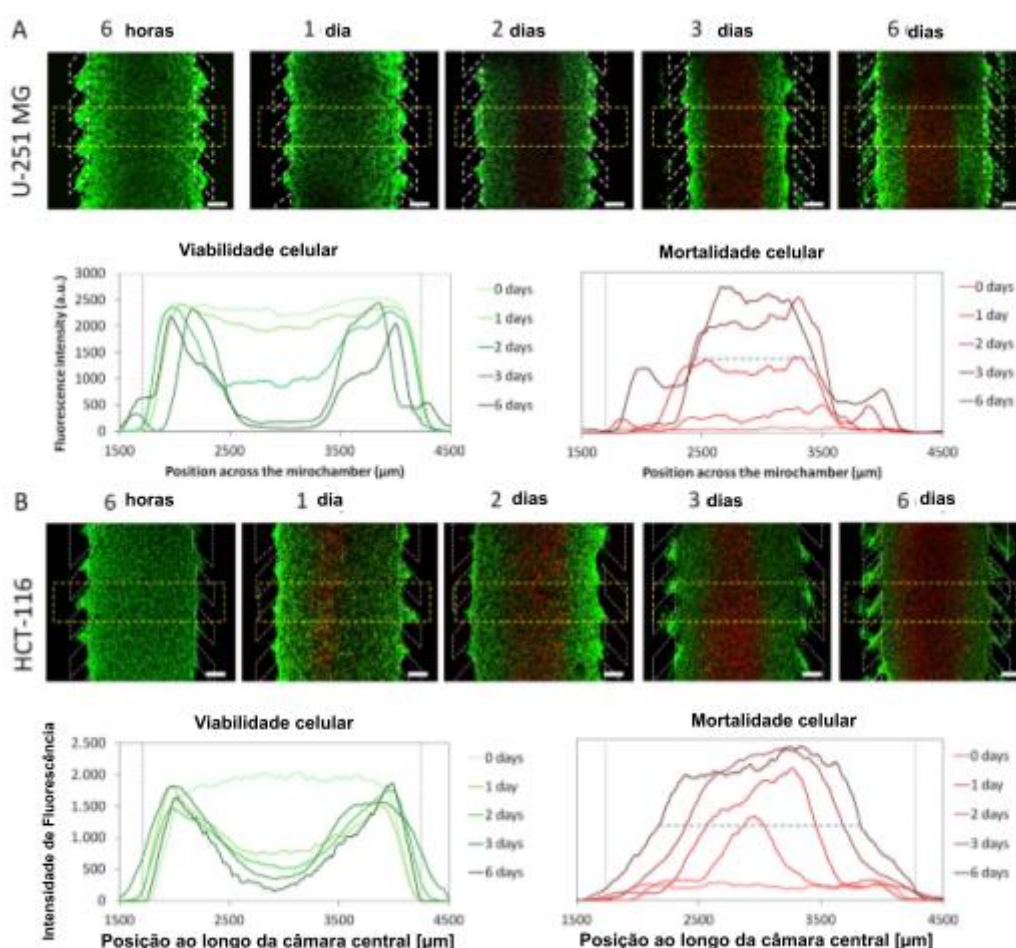
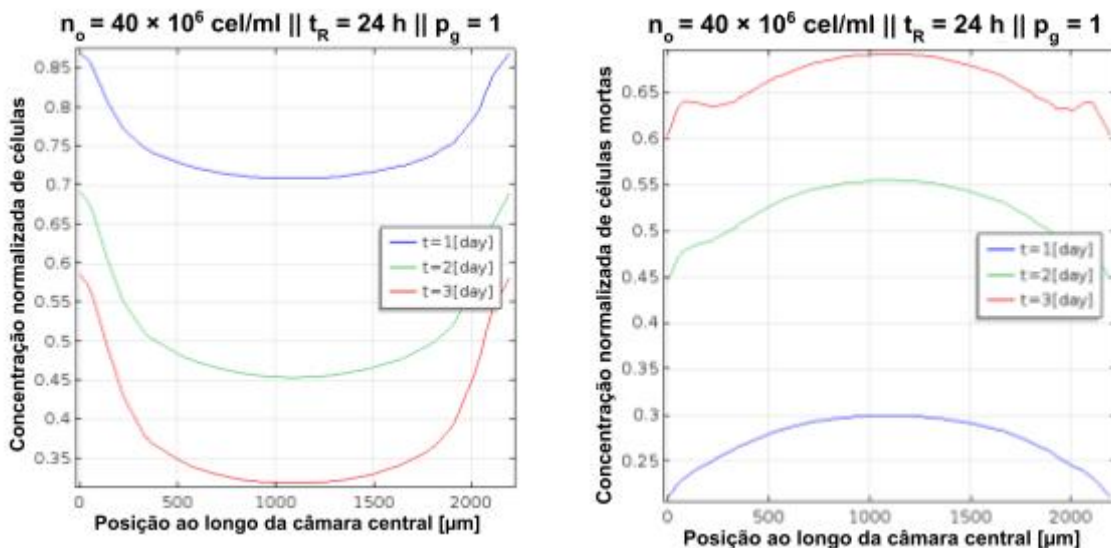


Figura 5.18 - Formação do núcleo necrótico no dispositivo de microfluídica considerando a densidade inicial de 40×10^6 cel/ml (A) células U-251 MG (B) células HCT-116 (Adaptado de AYUSO et al., 2016)

O parâmetro p_g usado para modelar o efeito Warburg está associado com a agressividade do tumor. Assim, o aumento do valor de p_g indica que as células consomem mais glicose, privando as células normais circundantes de nutrientes; aumentam a produção de ácido, diminuindo, portanto, o pH local do microambiente, dentre outros efeitos já mencionados. Dessa forma, o aumento do parâmetro p_g acarreta e acelera a formação do núcleo necrótico conforme reportado na literatura (SHAMSI et al. 2018).

Para efeitos de comparação foi conduzido um estudo, visando avaliar a representatividade do modelo considerando-se a densidade inicial de células no interior do dispositivo de 40×10^6 cel/ml, dois valores para p_g ($p_g = 1$ e $p_g = 1,2$) e renovação do meio de cultura a cada 24 h, conforme apresentado nas Figs.5.19 e 5.20.

Na Figura 5.19 é apresentada as curvas referente à densidade de células vivas e mortas no interior da câmara central para $p_g = 1$, na qual a viabilidade celular diminui no decurso do tempo (Fig. 5.19a) ao passo que a densidade de células mortas aumenta (Fig. 5.19b). A formação do núcleo necrótico é observada no primeiro dia com uma redução de 30 % na viabilidade celular. No terceiro dia de análise verifica-se cerca de 70 % de células mortas na região central do tumor. O ajuste de $p_g = 1$, neste caso, está relacionado com as células células U-251 MG.



(a)

(b)

Figura 5.19 - Formação do núcleo necrótico para $p_g = 1$ (a) células viáveis (b) células mortas

Analogamente, a Fig. 5.20 apresenta as curvas referente à densidade de células vivas e mortas para $p_g = 1,2$. A formação do núcleo necrótico dá-se significativamente mais rápida em comparação com $p_g = 1$, ou seja, uma redução de cerca de 60 % na viabilidade celular é observada no primeiro dia. Já para o terceiro dia observa-se cerca de 90 % de células mortas na região central do tumor. Neste caso, o ajuste de $p_g = 1,2$ é representativo das células HCT-116.

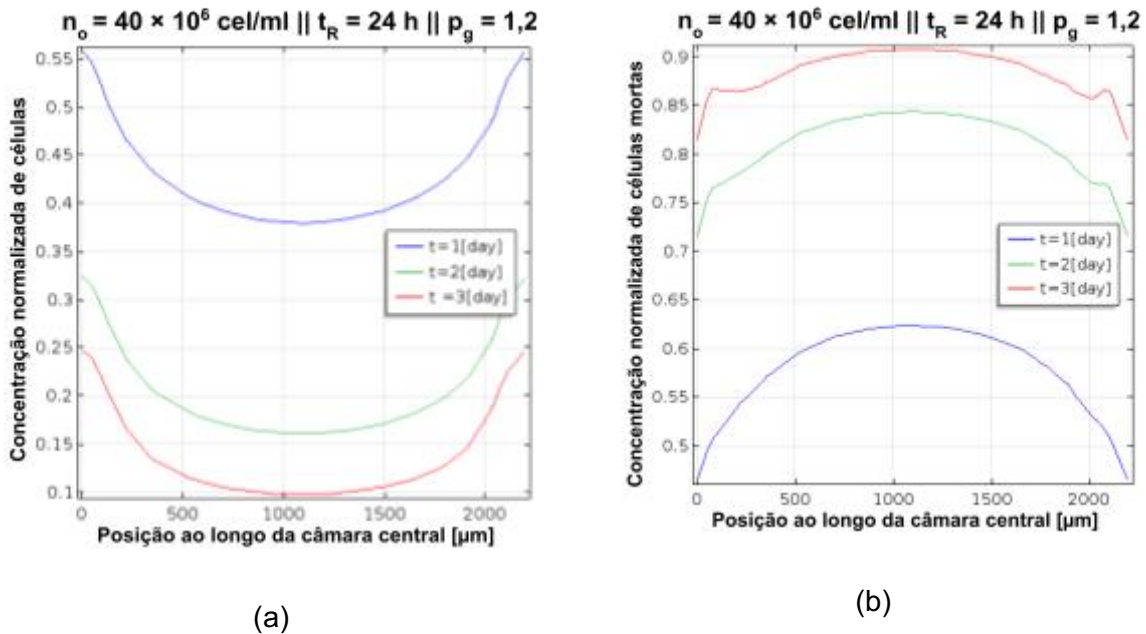


Figura 5.20 - Formação do núcleo necrótico para $p_g = 1.2$ (a) células viáveis (b) células mortas

iii. Proliferação de células

Além da formação do núcleo necrótico e o gradiente de concentração de glicose no dispositivo de microfluídica, Ayuso et al. (2016) avaliaram a proliferação das células tumorais no chip após 24 h. Para isso, os autores conduziram o estudo considerando-se uma densidade inicial 40×10^6 cel/ml e marcaram apenas 5 % do total de células imersas na câmara central para análise de fluorescência. Para quantificar as células proliferativas, os autores dividiram a câmara central em dez regiões e avaliaram os resultados referentes à proliferação das células tumorais após 24 h como apresentado na Fig. 5.21.

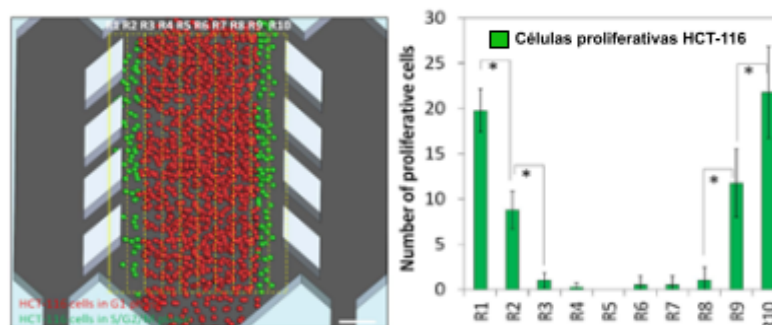


Figura 5.21 - Microcâmara central dividida em regiões para análise da proliferação das células tumorais após 24 h. A proliferação foi quantificada pelas células na cor verde (Adaptado de AYUSO et al., 2016).

Para efeitos de comparação, foi plotado um gráfico de barras para avaliar a taxa de proliferação celular em diferentes regiões da câmara central (Fig. 5.22a) após o período de 24 h. Pode-se observar nos gráficos das Fig. 5.22a-b que as regiões próximas dos canais laterais apresentaram um aumento na proliferação celular. Por outro lado, as regiões afastadas apresentaram uma diminuição na taxa de proliferação de células. Para esta configuração tem-se a formação do núcleo necrótico indicado anteriormente e, neste caso, a taxa de morte supera a proliferação. Contudo, para efeitos de comparação foi apresentado aqui apenas a taxa de proliferação celular.

Na Figura 5.22b é apresentado um gráfico de barras com uma estimativa do número de células em fase proliferativa. Baseando-se na concentração celular 40×10^6 cel/ml e nas dimensões do chip usado por Ayuso e colaboradores foi estimado cerca de $0,95 \times 10^5$ células no interior da câmara central. Considerando-se que apenas 5 % do total de células foram marcadas para análise de fluorescência, conforme descrito anteriormente, estima-se aproximadamente 4.750 células marcadas no interior da câmara central. Baseando-se na hipótese de que as células se distribuem uniformemente no interior da câmara central foi considerado o produto da taxa de variação das células pela quantidade de células em cada região. Para exemplificar, consideremos a região R1 em que a taxa de variação foi cerca de 0,075 e a quantidade de células em torno de 475, a quantidade de células tumorais proliferativas é cerca de 35 conforme Fig. 5.22b. Esses valores estão próximos daqueles apresentados no trabalho experimental conduzido por Ayuso et al. (2016) mostrado na Fig. 5.21.

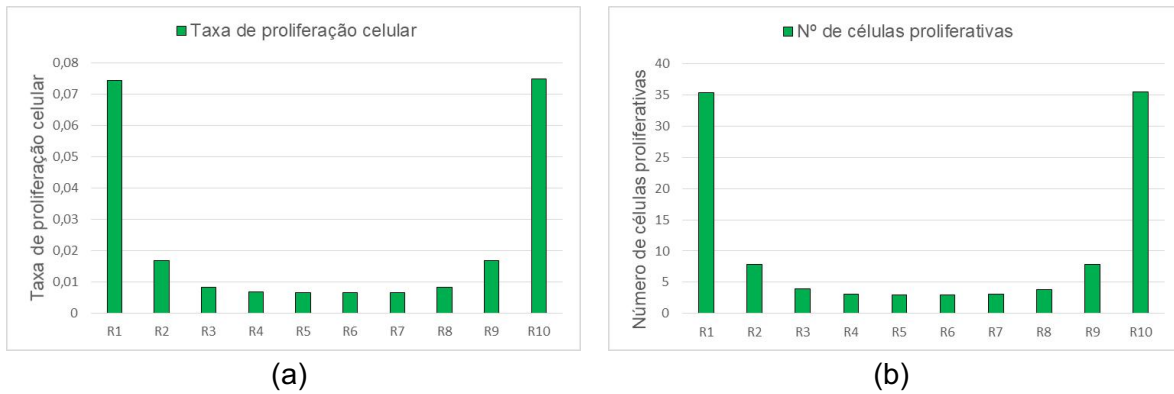


Figura 5.22 – (a) taxa de proliferação celular e (b) número de células proliferativas ao longo da câmara central após 24 h de análise.

5.4. Resultados obtidos usando o modelo com células

A seguir são apresentados os resultados referentes aos estudos de caso dispostos no Quadro 3.1 do capítulo III.

5.4.1. Caso 01 - Mudança de regime de renovação

A fim de avaliar a influência da renovação do meio de cultura sobre o comportamento celular foram considerados três regimes de renovação: 6 h, 12 h e 24 h, por um período de três dias. A seguir são apresentados os resultados referentes a esse caso.

Nas Figuras 5.23 a 5.26 são apresentados os resultados obtidos para os casos de renovação 6 h, 12 h e 24 h, e densidade inicial de células $n_0 = 1 \times 10^6$ cel/ml. Em todos os casos constata-se que a proliferação superou a morte e, portanto, a densidade celular aumenta ao longo dos dias de análise (Fig. 5.23). Além disso, verifica-se que não há a formação de um núcleo necrótico nestas condições. Na Figura 5.24 é representada a densidade de células mortas após o primeiro, segundo e terceiro dias. Verifica-se uma taxa de morte aproximadamente constante atingindo cerca de 20 % da densidade inicial após o terceiro dia.

Para o primeiro dia de análise a proliferação celular é aproximadamente constante ao longo da câmara central para todas as situações de renovação do meio de cultura analisadas. Já para o segundo e terceiro dias o comportamento da proliferação é similar apenas para os regimes de renovação de 6 h e 12 h na qual observa-se uma taxa

acentuada de proliferação próximo dos canais laterais, de acordo com as Fig. 5.23a-b, e redução à medida que aproxima-se da região central do chip.

Ademais, para a condição de renovação de 6 h, podemos observar que a densidade celular, ao final do segundo dia, é constante por cerca de 300 μm a partir dos canais laterais em direção ao centro da câmara central a partir do qual apresenta uma queda na concentração de células. Comportamento similar é observado no terceiro dia, contudo, o decaimento na densidade celular já é observado a uma distância cerca de 100 μm a partir dos canais laterais (Fig. 5.23a).

Para o regime de renovação de 12 h, apresentado na Fig. 5.23b, a densidade celular para os dias 2 e 3 apresenta um comportamento decrescente atingindo o mínimo na região central do chip. Além disso, a densidade celular para os dias 2 e 3 no centro da câmara central é a mesma, sendo, portanto, a taxa de proliferação é igual a taxa de morte.

O aumento da densidade celular próximo dos canais laterais altera o campo de concentração de nutrientes no interior do chip limitando, portanto, a disponibilidade de nutrientes para as células da região central. Essa privação de nutrientes na região central do tumor (Fig. 5.25) diminui acentuadamente a taxa de proliferação das células podendo levar à formação do núcleo necrótico conforme observado em tumores *in vivo*.

Na Figura 5.25 é apresentado que na região central da câmara central a disponibilidade de nutrientes é inferior à concentração crítica de glicose G_c e, portanto, os termos de morte presente neste caso são devido à privação de nutrientes e apoptose. A taxa de morte é aproximadamente constante e igual para todos os diferentes tipos de renovação do meio de cultura analisadas.

A taxa de proliferação é constante ao longo da câmara central para o caso de renovação a cada 24 h, conforme mostrada na Fig. 5.23c. Em decorrência do maior tempo de renovação do meio de cultura, os nutrientes tendem a homogeneizar-se no interior da câmara central, ou seja, o campo de concentração de glicose é uniforme no interior do chip conforme observado pela Fig. 5.25c.

A taxa de produção de H^+ está diretamente relacionada com a densidade celular. Na Figura 5.26 é mostrado o pH no interior da câmara central do dispositivo. Após o primeiro dia, para o regime de renovação de 6 h, observa-se que o pH próximo dos canais laterais é aproximadamente 6,2 e à medida que se distancia dos canais o pH diminui para 5,9 (Fig. 5.26a). Comportamento similar é observado para o regime de renovação de 12 h, conforme ilustrado na Fig. 5.26b. Já para o caso de renovação a cada 24 h observa-se um

perfil constante das curvas que representam o pH (Fig. 26c). Isso se dá em função do tempo disponível para a difusão molecular. Assim, o campo de concentração tende a uniformizar-se. Além disso, em decorrência do maior tempo de renovação verifica-se que existe uma maior acumulação de íons H^+ no interior da câmara central que resulta em um ambiente mais ácido como mostrado na Fig. 5.26c.

Nas Figuras 5.27 a 5.30 são apresentadas as respostas da variação do regime de renovação (6 h; 12 h; 24 h) para a densidade inicial de células de 40×10^6 cel/ml. Na Figura 5.27 é mostrada a variação da concentração celular ao longo da câmara central para os dias 1, 2 e 3 e é possível observar já no primeiro dia a formação do núcleo necrótico, ou seja, a presença de células mortas na região central da câmara central.

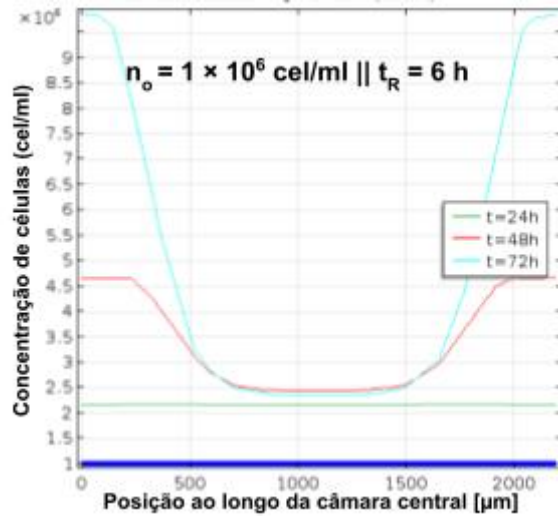
Na Figura 5.27a é mostrada uma região próxima dos canais laterais em que a proliferação celular é preponderante. Para a condição de renovação a cada 6 h (Fig. 5.27a) pode-se observar que a taxa de proliferação é superior à taxa de morte próxima dos canais laterais e, portanto, a densidade celular aumenta nesta região, pois o meio está mais favorável, *i.e.*, as células estão melhor nutridas e os íons H^+ , resultantes da produção das células nesta região são carregados pelos canais laterais. Isso não é observado para as demais condições, conforme ilustram as Fig. 5.27b e Fig. 5.27c.

A elevada produção de H^+ está associada ao efeito Warburg discutido anteriormente. O modelo utilizado para simular a produção de íons H^+ foi baseado nos trabalhos de Robertson-Tessi et al. (2017) e Shamsi et al. (2018) na qual estabelece que a produção de H^+ é proporcional à densidade celular e ao parâmetro pg . Dessa forma, pode-se observar que o pH diminui rapidamente no interior da câmara central para valores abaixo de pH igual a 5 (Fig. 5.30). Em decorrência das condições consideradas para a simulação, ou seja, renovação a cada 6 h, 12 h e 24 h, existe em todos os casos o acúmulo de H^+ no interior do chip e, portanto, um ambiente mais ácido.

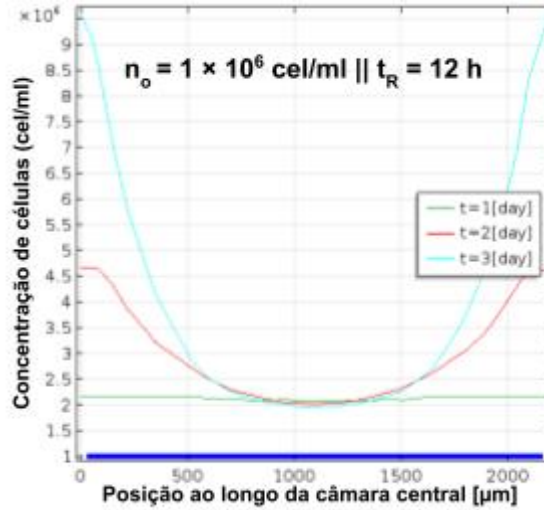
As células próximas dos canais laterais são melhor nutridas do que aquelas que estão na região central da câmara central do chip. Assim, devido à privação de nutrientes associado ao acúmulo de H^+ na região central, a taxa de mortalidade celular é acentuada conforme observado nas Fig. 5.27 e Fig. 5.28. A Figura 5.27 mostra a densidade celular para o caso de renovação de 24 h em que cerca de 70 % das células na região central morrem após um período de três dias, evidenciando, portanto, a formação do núcleo necrótico.

A elevada densidade celular altera a dinâmica da difusividade celular, ou seja, a presença de células reduz a mobilidade molecular no interior do dispositivo resultando tanto

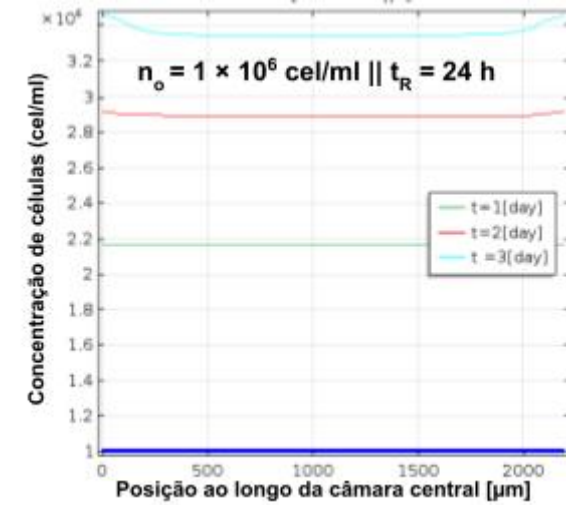
no acúmulo de H^+ na região central do chip (Fig. 5.30) quanto na privação de nutrientes provenientes dos canais laterais, dificultando, portanto, o transporte de glicose dos canais laterais para o interior da câmara central. A concentração de glicose conforme observado na Fig. 5.29 é baixa no final dos dias de análise devido à elevada concentração de células que consomem rapidamente os nutrientes fornecido



(a)

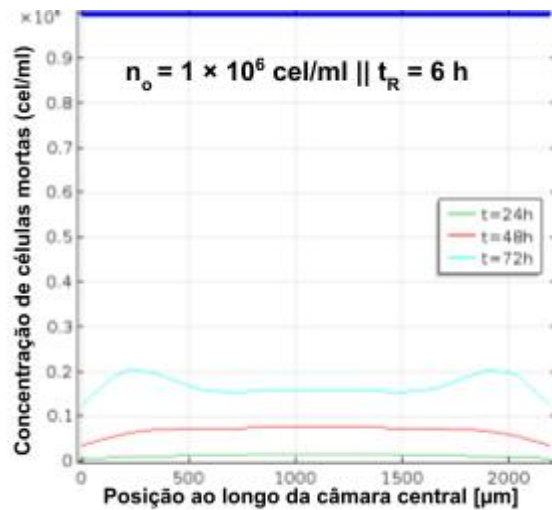


(b)

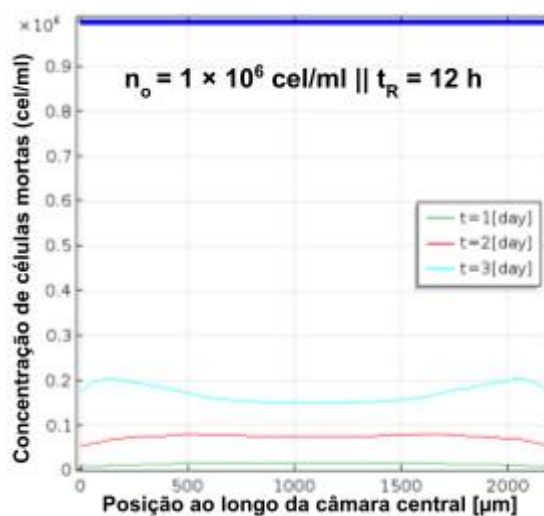


(c)

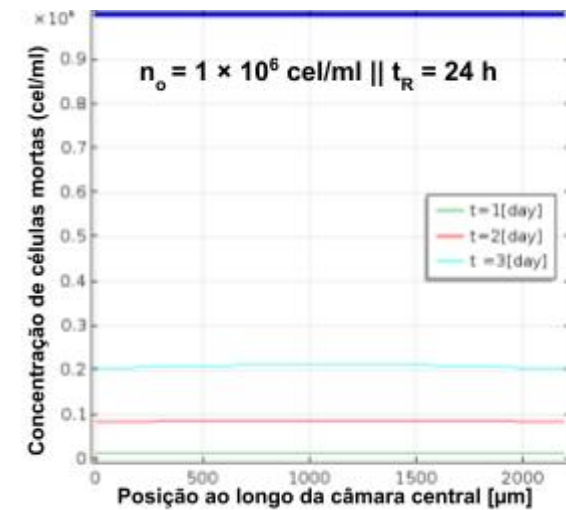
Figura 5.23 – Concentração de células no interior da câmara central para o Caso 1 – $n_o = 1 \times 10^6 \text{ cell/ml}$ e diferentes tempos de renovação do meio de cultura. A linha azul indica a concentração inicial de células.



(a)

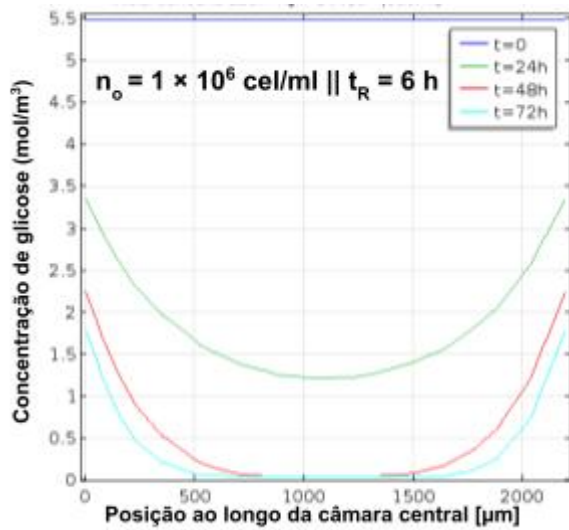


(b)

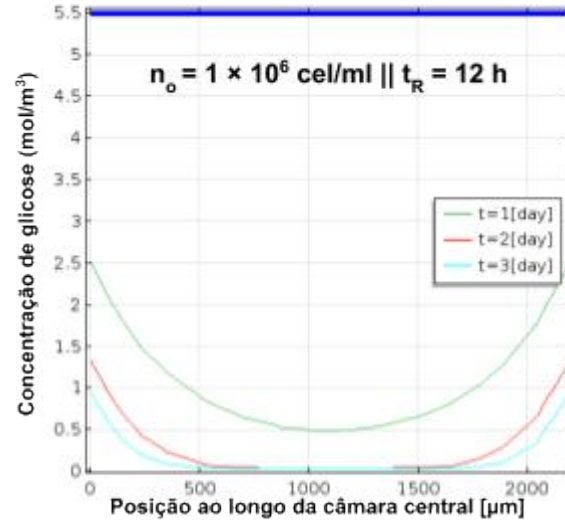


(c)

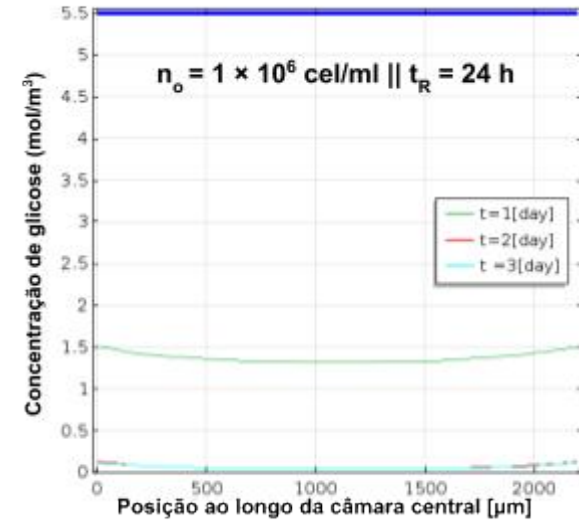
Figura 5.24 – Concentração de células mortas no interior da câmara central para o Caso 1 – $n_o = 1 \times 10^6 \text{ cel/ml}$ e diferentes tempos de renovação do meio de cultura. A linha azul indica a concentração inicial de células vivas.



(a)

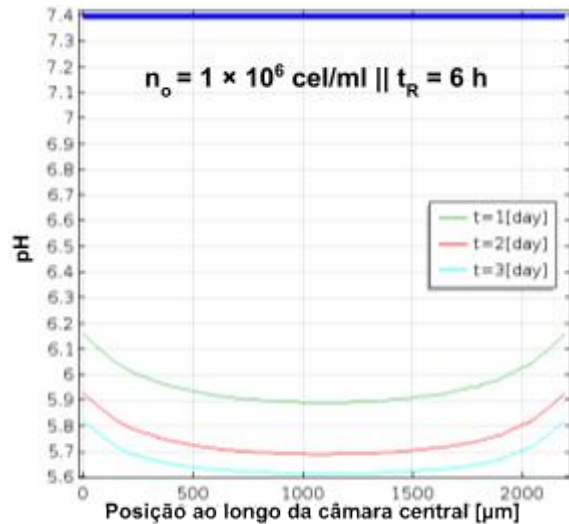


(b)

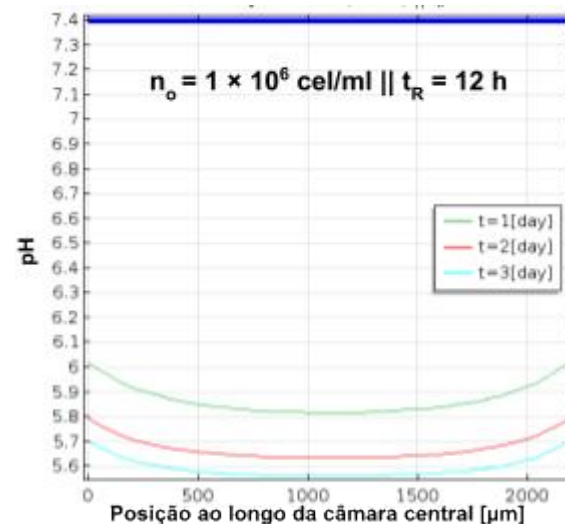


(c)

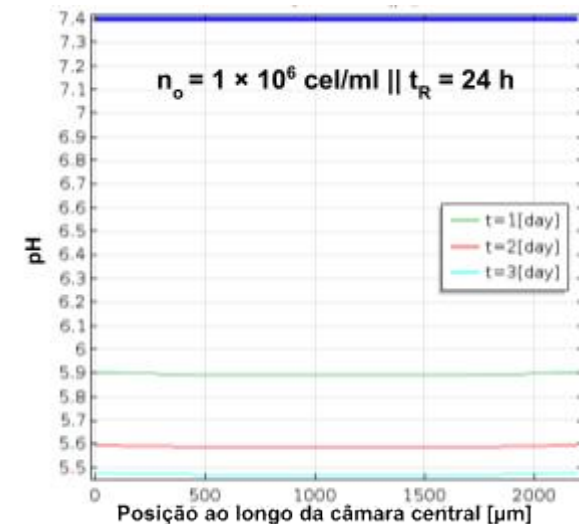
Figura 5.25 – Concentração de glicose no interior da câmara central para o Caso 1 – $n_o = 1 \times 10^6 \text{ cel/ml}$ e diferentes tempos de renovação do meio de cultura. A linha azul indica a concentração inicial de glicose.



(a)

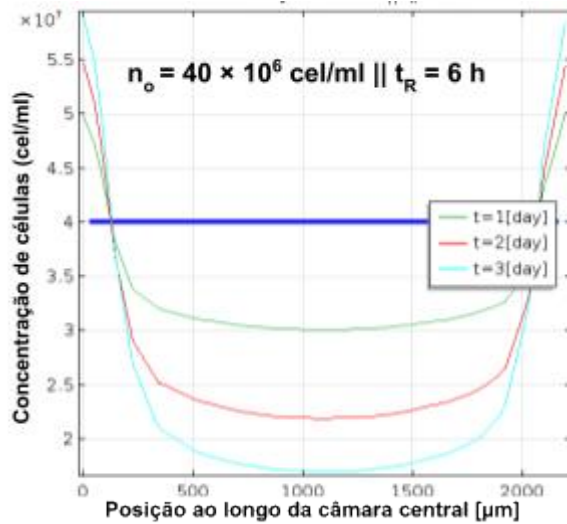


(b)

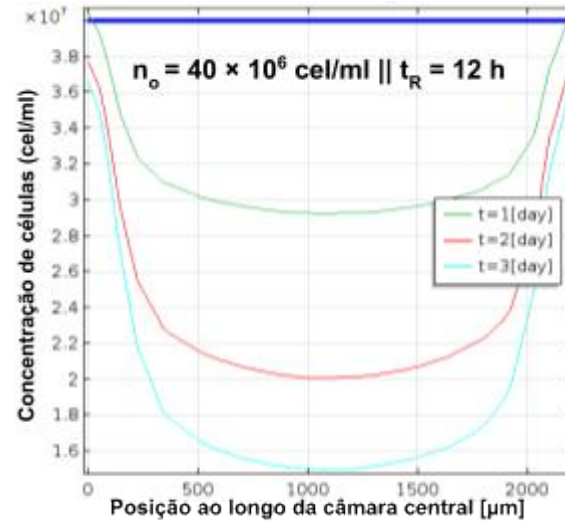


(c)

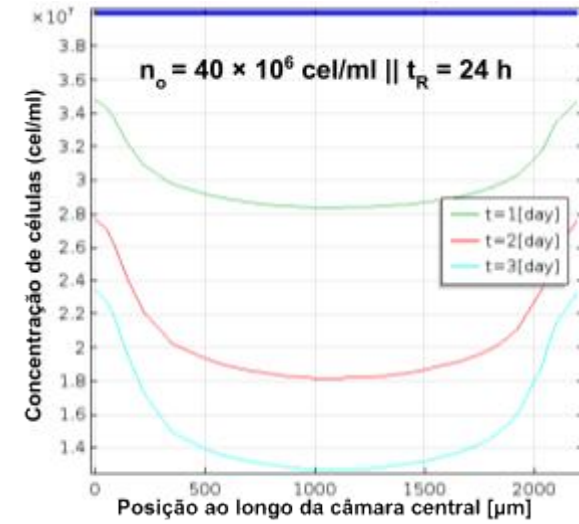
Figura 5.26 – pH no interior da câmara central para o Caso 1 – $n_o = 1 \times 10^6 \text{ cel/ml}$ e diferentes tempos de renovação do meio de cultura. A linha azul indica pH inicial.



(a)

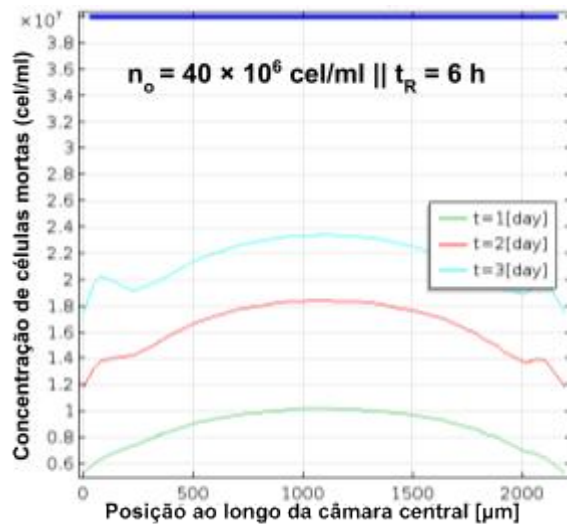


(b)

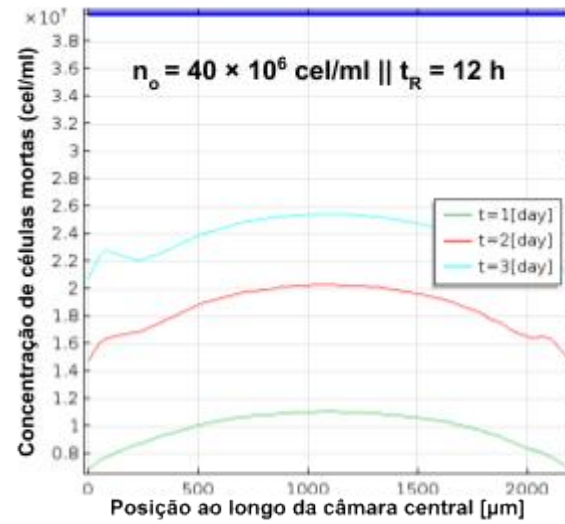


(c)

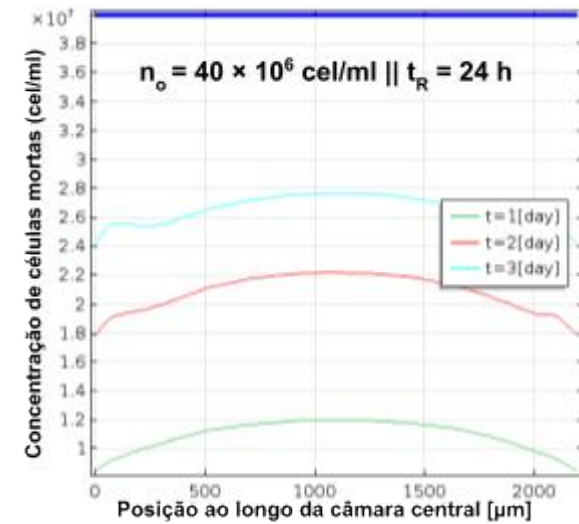
Figura 5.27 – Concentração de células no interior da câmara central para o Caso 1 – $n_o = 40 \times 10^6 \text{ cel/ml}$ e diferentes tempos de renovação do meio de cultura. A linha azul indica a concentração inicial de células.



(a)

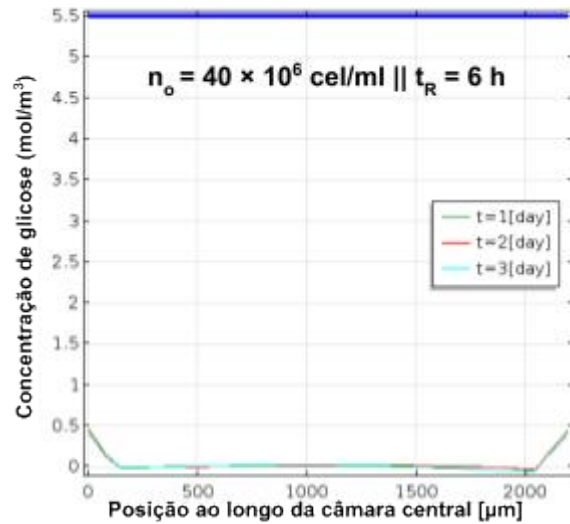


(b)

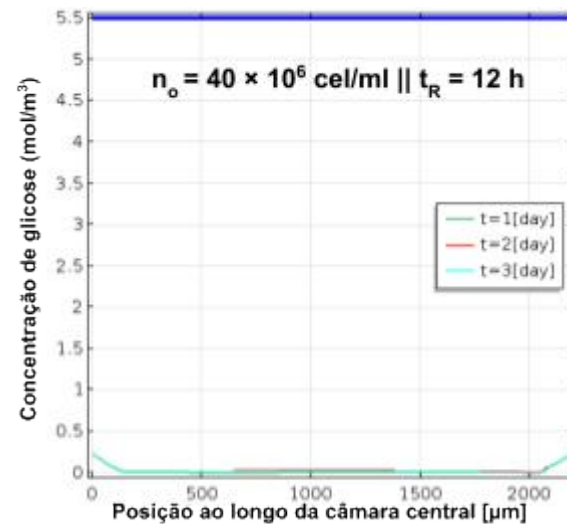


(c)

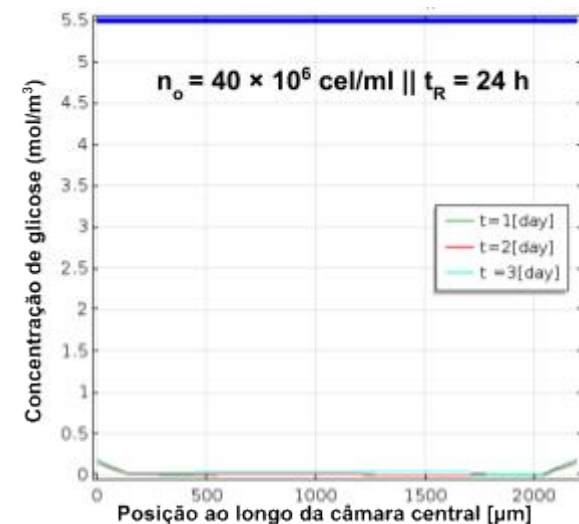
Figura 5.28 – Concentração de células mortas no interior da câmara central para o Caso 1 – $n_o = 40 \times 10^6 \text{ cel/ml}$ e diferentes tempos de renovação do meio de cultura. A linha azul indica a concentração inicial de células.



(a)

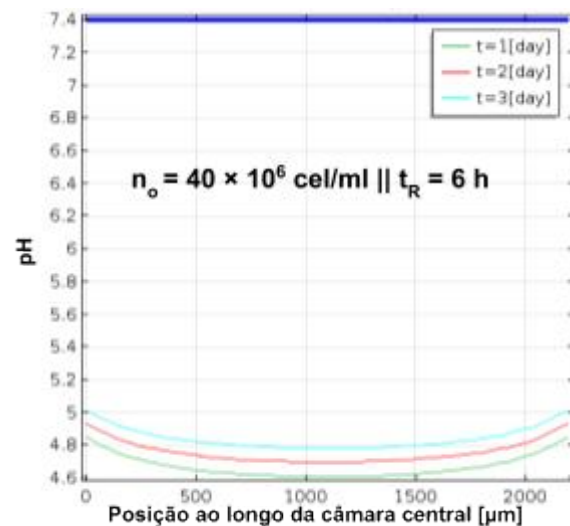


(b)

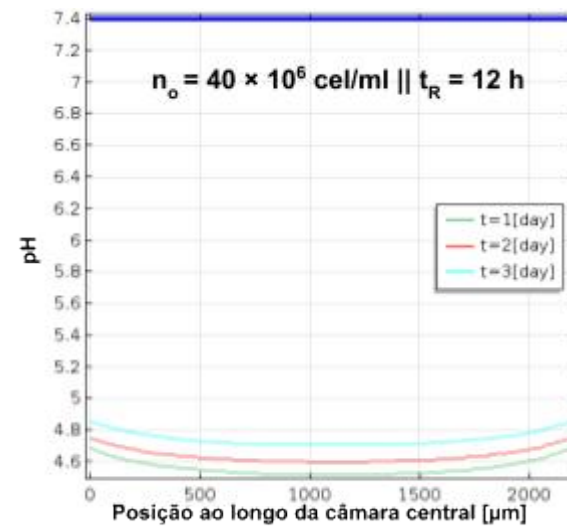


(c)

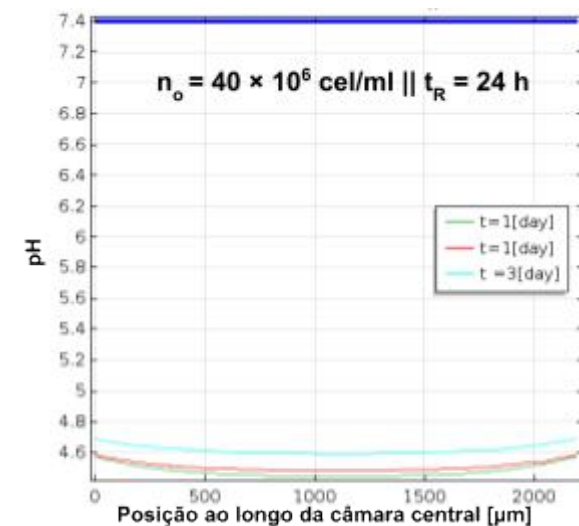
Figura 5.29 – Concentração de glicose no interior da câmara central para o Caso 1 – $n_o = 40 \times 10^6 \text{ cel/ml}$ e diferentes tempos de renovação do meio de cultura. A linha azul indica a concentração inicial de glicose.



(a)



(b)



(c)

Figura 5.30 – pH no interior da câmara central para o Caso 1 – $n_o = 40 \times 10^6 \text{ cel/ml}$ e diferentes tempos de renovação do meio de cultura. A linha azul indica pH inicial.

5.4.2. Caso 02 - Variação da densidade inicial de células

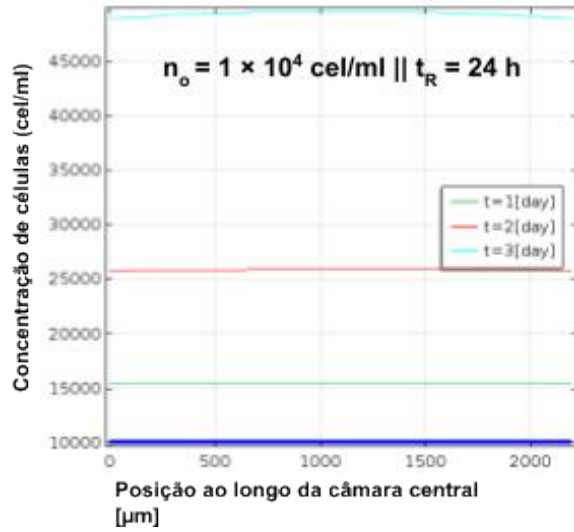
Foi avaliado o comportamento celular considerando-se diferentes densidades iniciais de células (n_0) no interior da câmara central do dispositivo. O estudo foi conduzido, portanto, para $n_0 = 1 \times 10^4$; 1×10^5 ; 1×10^6 ; 4×10^6 ; 10×10^6 ; 40×10^6 cel/ml, e regime de renovação do meio de cultura a cada 24 h, sendo os demais parâmetros mantidos constantes.

A densidade inicial de células é um parâmetro que influencia diretamente a distribuição das moléculas no interior do dispositivo de microfluídica. Quanto maior a concentração inicial de células, maior deverá ser o consumo dos nutrientes disponíveis. Para elevadas concentrações de células (ex. 40×10^6 cel/ml), menor deverá ser a quantidade de nutrientes disponíveis para as células que estão mais distantes dos canais laterais, ou seja, no núcleo do tumor, devido ao consumo das células próximos dos canais laterais e pela redução na difusividade efetiva da glicose. Conforme destacado anteriormente, elevadas concentrações de células alteram a difusividade efetiva das moléculas no interior do dispositivo. O núcleo necrótico é uma característica observada em tumores *in vivo* e a privação de nutrientes juntamente com a acidez no microambiente tumoral promovem à formação do núcleo necrótico conforme reporta a literatura (KIRAN, JAYACHANDRAN, et al., 2009, SHAMSI, SAGHAFIAN, et al., 2018, SMALLBONE, GATENBY, et al., 2008, WARD; KING, 1997).

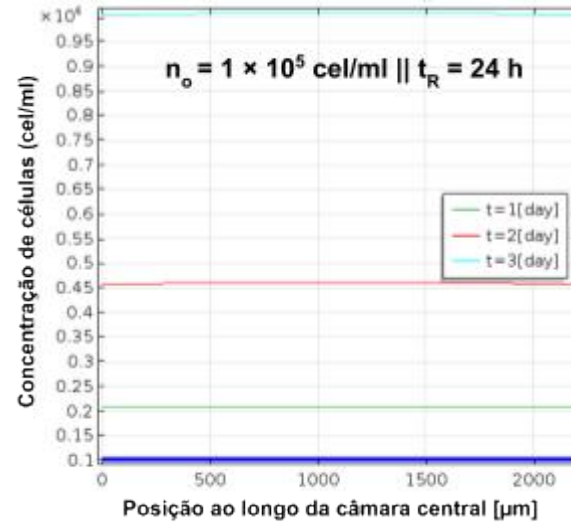
Para os casos em que a concentração inicial de células é baixa não é observada a formação do núcleo necrótico após um período de três dias, conforme mostram as Fig. 5.31a-d. Nestes casos, a proliferação é aproximadamente constante ao longo da câmara central. Isto está relacionado com um microambiente favorável ao crescimento tumoral, ou seja, disponibilidade de nutrientes e redução do pH a níveis prejudiciais às células saudáveis, porém favorável à proliferação das células tumorais (Fig. 5.33a-c). Os nutrientes para estes casos se difundem para o interior da câmara central e atingem todo o domínio em que estão as células, *i.e.*, alcançam o núcleo do tumor (Fig. 5.32a-c). É importante destacar que em função do tempo de renovação (24 h), os nutrientes (glicose) e resíduos metabólicos produzidos pelas células tendem a se distribuir uniformemente na câmara central.

A taxa de morte é acentuada à medida que o tempo decorre para os casos em que a concentração inicial de células é mais elevada (Fig. 5.31e-f). Conforme a densidade de células aumenta, o consumo de nutrientes aumenta e, por consequência, a distribuição de nutrientes é afetada, ou seja, menor é a quantidade de nutrientes para se difundir para o interior da câmara central. Além disso, a difusão dos nutrientes é dificultada com o aumento

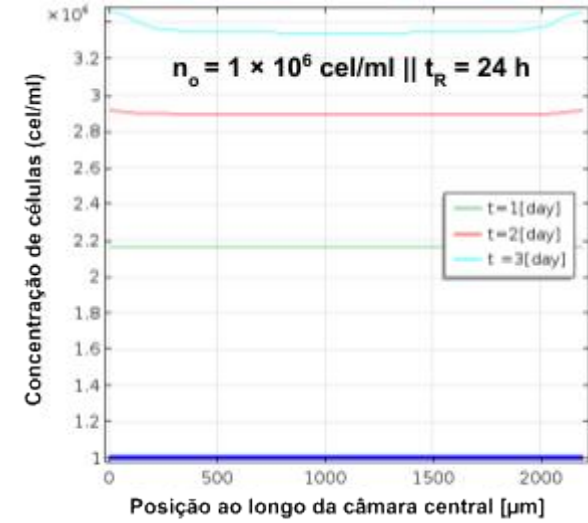
da densidade celular devido aos efeitos discutidos anteriormente. Ademais, a taxa de produção de H^+ é aumentada com a densidade celular e, nesse ambiente ácido, que aumenta no decurso do tempo, a morte celular é aumentada, sobretudo na região central da câmara central.



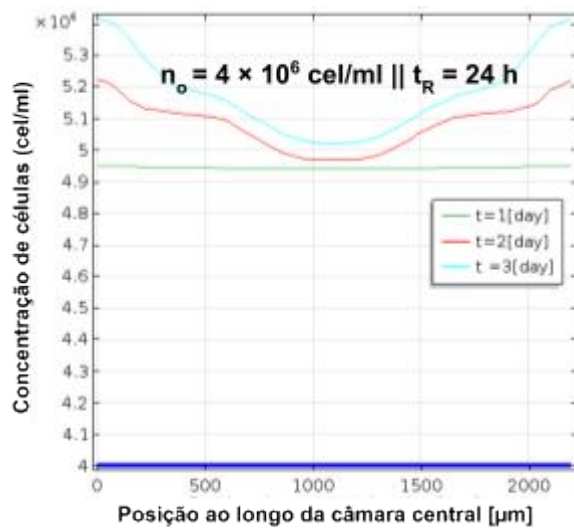
(a)



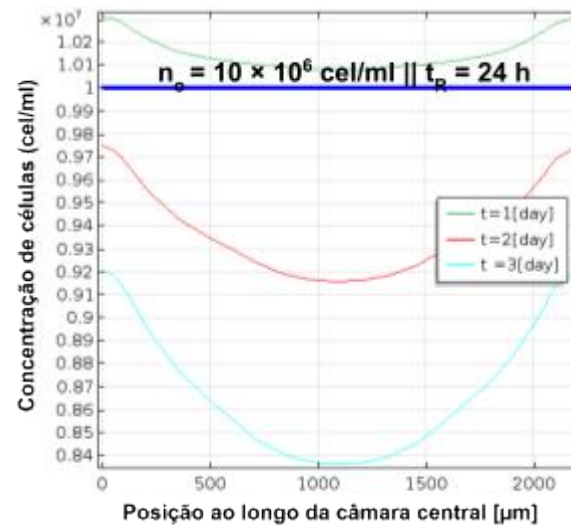
(b)



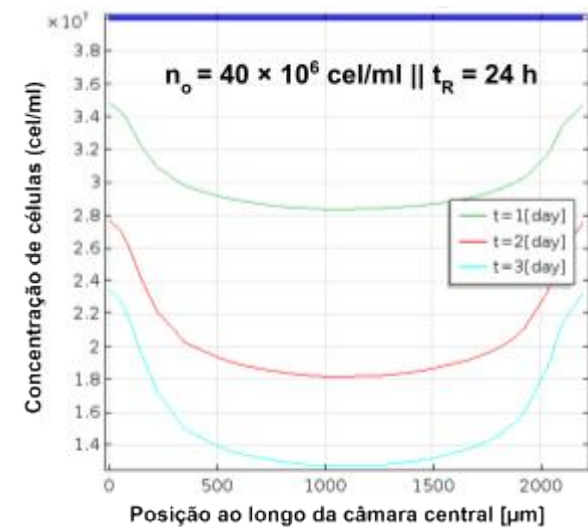
(c)



(d)

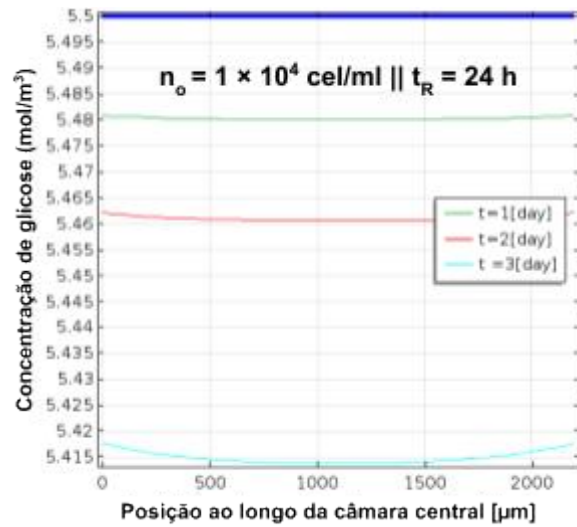


(e)

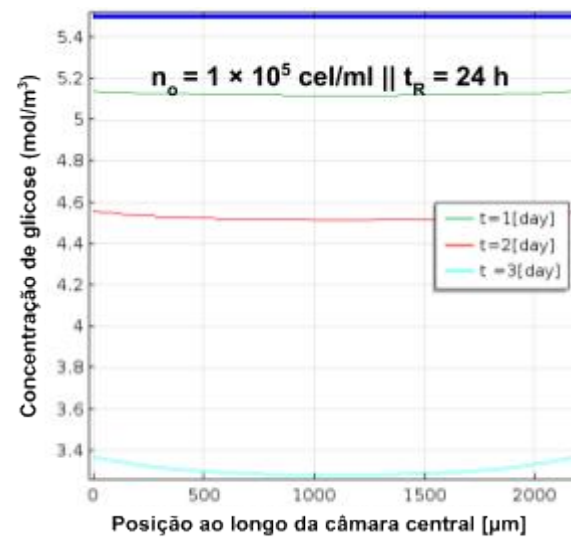


(f)

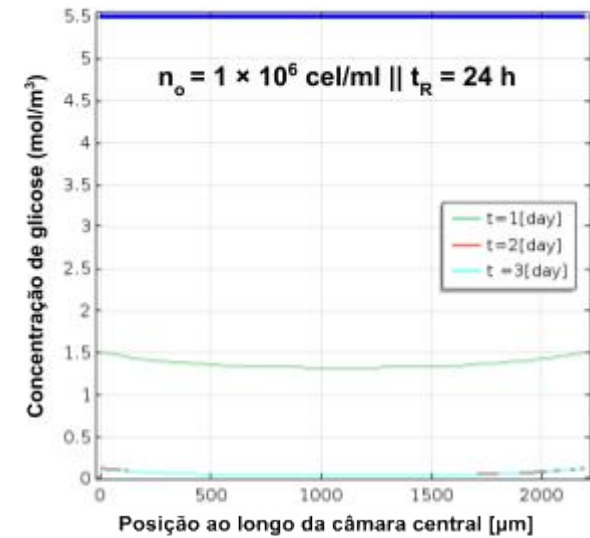
Figura 5.31 – Concentração de células no interior da câmara central para o Caso 02 – (a) 1×10^4 (b) 1×10^5 (c) 1×10^6 (d) 4×10^6 (e) 10×10^6 (f) 40×10^6 cel/ml. A linha azul indica a concentração inicial de células.



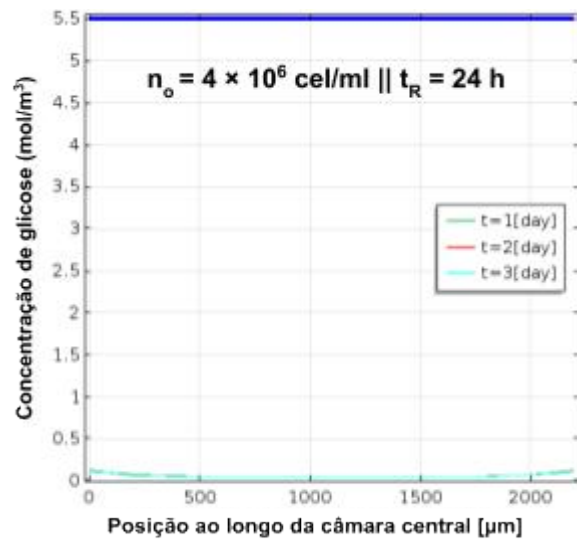
(a)



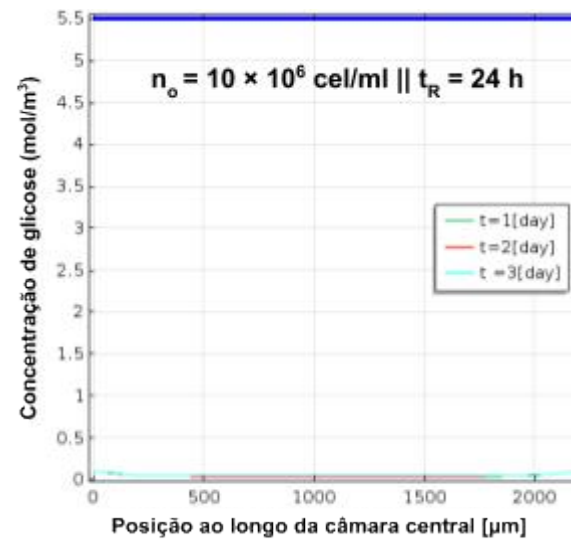
(b)



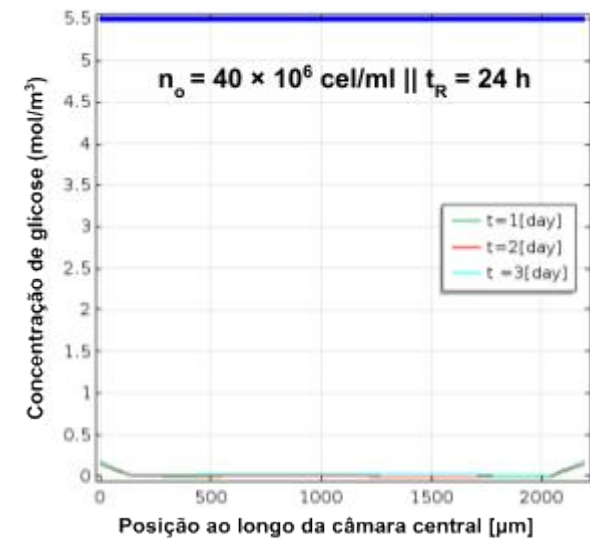
(c)



(d)

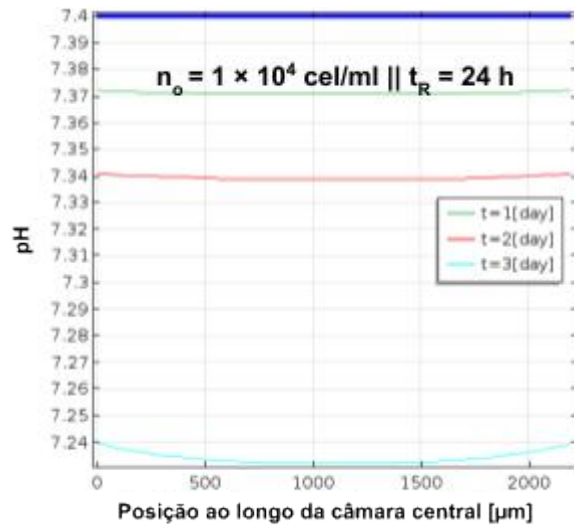


(d)

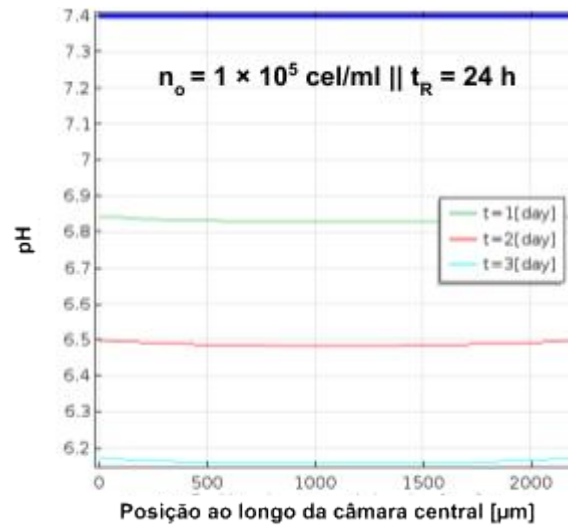


(e)

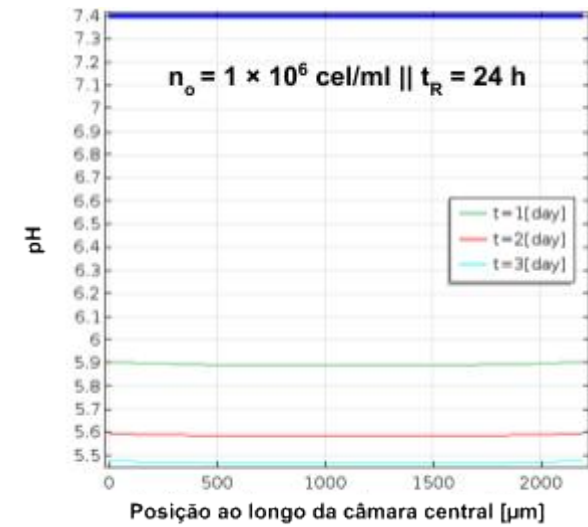
Figura 5.32 – Concentração de glicose no interior da câmara central para o Caso 02 – (a) 1×10^4 (b) 1×10^5 (c) 1×10^6 (d) 4×10^6 (e) 10×10^6 (f) 40×10^6 cel/ml. A linha azul indica a concentração inicial de glicose.



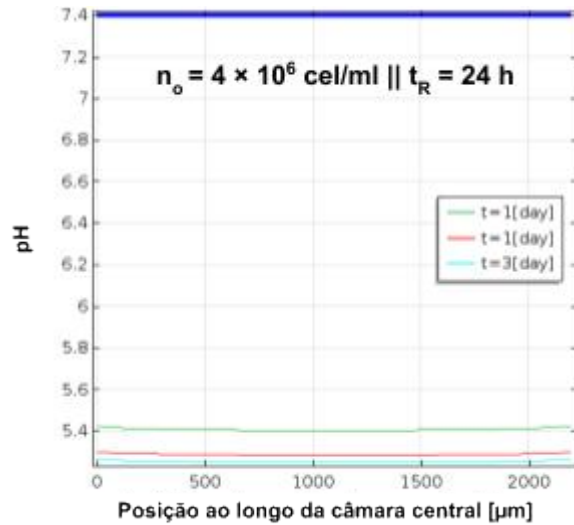
(a)



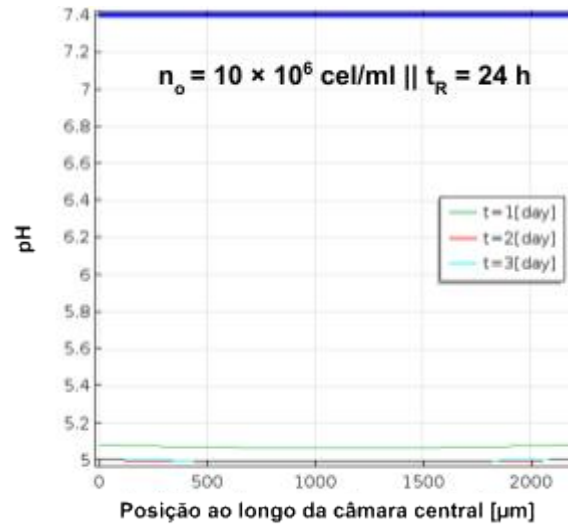
(b)



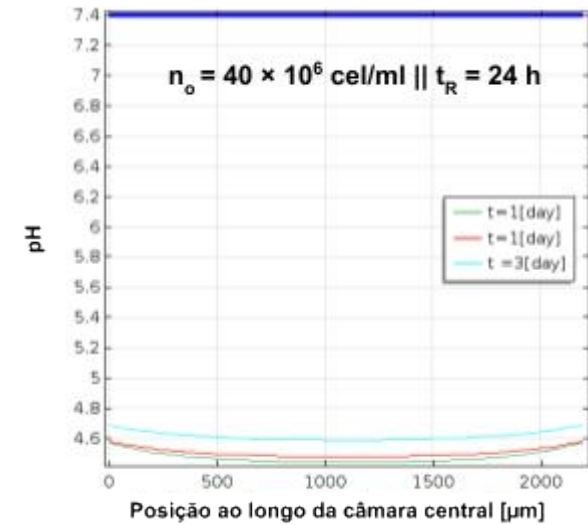
(c)



(d)



(e)



(f)

Figura 5.33 – pH no interior da câmara central para o Caso 02 – (a) 1×10^4 (b) 1×10^5 (c) 1×10^6 (d) 4×10^6 (e) 10×10^6 (f) 40×10^6 cel/ml. A linha azul indica pH inicial.

5.4.3. Caso 03 - Mudança geométrica

A mudança na geometria foi proposta considerando a variação da largura dos canais laterais e a largura da câmara central. Essas alterações foram avaliadas para a densidade inicial de células de $n_0 = 1 \times 10^6$ cel/ml. Foram considerados os seguintes valores das dimensões do chip.

- Largura da câmara central: 0,5 W; W; 1,5 W
- Largura dos canais laterais: 0,75 L; L ; 1,5 L

em que W representa a largura da câmara central, sendo $W = 2.200 \mu\text{m}$ e L representa a largura dos canais laterais, sendo $L = 700 \mu\text{m}$.

Para o estudo da influência das dimensões dos canais laterais no comportamento das células tumorais, foram considerados três valores para a largura dos canais laterais, sendo 0,75 L, L, 1,5 L, ou seja, larguras de 525 μm , 700 μm e 1050 μm . As Figuras 5.34 – 5.36 apresentam os resultados da densidade de células, concentração de glicose e pH respectivamente no interior da câmara central para as diferentes configurações mencionadas para três dias de análise.

Na Figura 5.34 é apresentada a concentração de células ao longo da câmara central para diferentes dimensões dos canais laterais. Após o primeiro dia, a densidade celular é aproximadamente constante ao longo da câmara central para todas as dimensões dos canais laterais avaliadas e, além disso, apresentam a mesma densidade celular.

A disponibilidade de nutrientes foi suficiente para promover a proliferação em toda a câmara central. A partir do segundo e terceiro dias observa-se diferenças na concentração celular no interior da câmara central em função da largura dos canais laterais. A configuração que possui a maior largura do canal lateral ($L_{\text{new}} = 1,5 L$) apresenta a maior concentração de células, isto é, cerca de 15 % maior que a configuração com a menor dimensão do canal lateral após os dias 2 e 3 (Fig. 5.34a-c). Isso ocorre, pois o canal com maior largura dispõe de maior quantidade de nutrientes para fornecer às células na câmara central (Fig. 5.35a-c).

O pH do microambiente tumoral, isto é, da câmara central, é menor para a configuração que apresenta a menor dimensão dos canais laterais e maior para o dispositivo com maior largura dos canais laterais com diferença cerca de 0,1 após o primeiro dia, conforme mostrado na Fig. 5.36. A diferença no pH tende a diminuir no

decurso do tempo sendo que em todas as configurações estudadas o pH é aproximadamente igual a 5,5 no terceiro dia (Fig. 5.36).

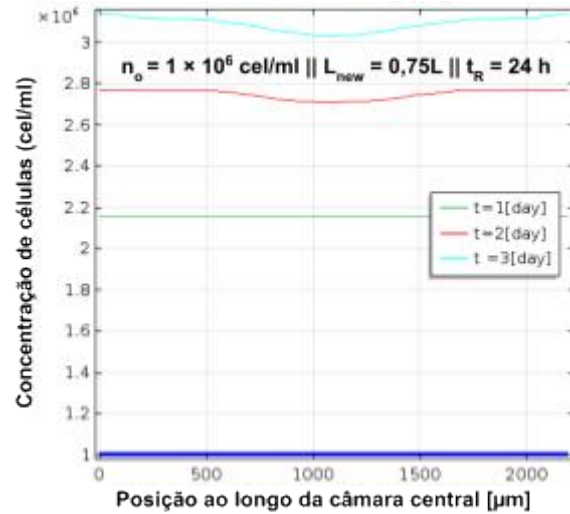
Para o estudo da influência das dimensões da câmara central foram considerados três valores para a largura, sendo $0,5 W$, W , $1,5 W$, ou seja, larguras de $1.100 \mu\text{m}$, $2.200 \mu\text{m}$ e $3.300 \mu\text{m}$. A alteração da largura implica, por exemplo, em alterar as distâncias para os nutrientes atingirem o núcleo do tumor, uma vez que a fonte de nutrientes é proveniente dos canais laterais.

Nas Figuras 5.37 a 5.39 são apresentadas a densidade de células, campo de concentração de glicose e pH respectivamente no interior da câmara central para os diferentes valores de largura da câmara central. Consta-se que as dimensões da câmara central, domínio em que estão presentes as células tumorais, têm papel relevante no comportamento celular, pois afetam diretamente no gradiente de concentração das moléculas no seu interior.

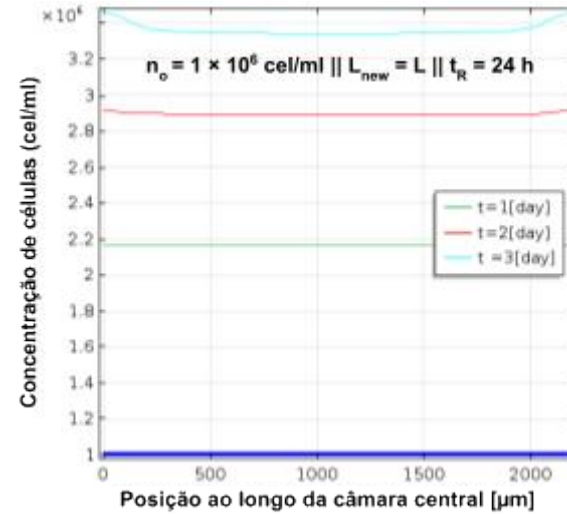
Para o caso em que a largura da câmara central é a menor, *i.e.*, $W_{\text{new}} = 0,5 W$, constata-se que a taxa de proliferação é superior relativa às demais dimensões para todos os dias analisados, como ilustrado na Fig. 5.37. Observa-se que a densidade celular é cerca de 20 % maior que a densidade celular apresentada no chip com a dimensão padrão, ou seja, para $W = 2.200 \mu\text{m}$ e 40 % maior em relação à configuração que apresenta a maior largura da câmara central, isto é, $W_{\text{new}} = 1,5 W$.

Os nutrientes se difundem mais rapidamente na configuração do microchip que apresenta a menor dimensão da câmara central e, portanto, favorece a proliferação celular. Para o microchip cuja largura da câmara central é $0,5 W$ verifica-se que a disponibilidade de nutrientes após o primeiro dia é cerca de 40 % maior que a apresentada pelo dispositivo de largura W e 80 % maior que o chip de largura $1,5 W$ (Fig. 5.38).

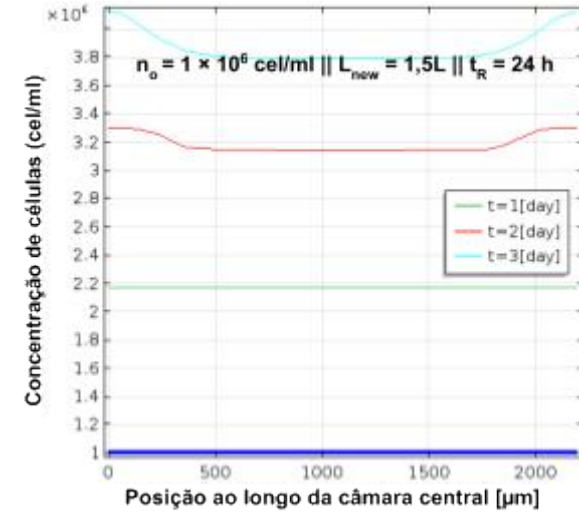
Ademais, associado à disponibilidade de nutrientes constata-se que devido à menor dimensão da câmara central menor o acúmulo de íons H^+ , reduzindo, portanto, a taxa de morte devido à acidez (k_{dpH}), uma vez que esta taxa de morte varia linearmente com a concentração de H^+ (Fig. 4.15). O modelo matemático contempla a morte em decorrência da acidez para valores correspondentes a pH inferiores à 6,0 conforme já mencionado no capítulo IV. Assim, o termo de morte devido ao pH não é contabilizado para o microchip com a menor largura da câmara central para o primeiro dia (Fig. 5.39a), ao contrário das demais configurações (Fig. 5.39b-c)



(a)

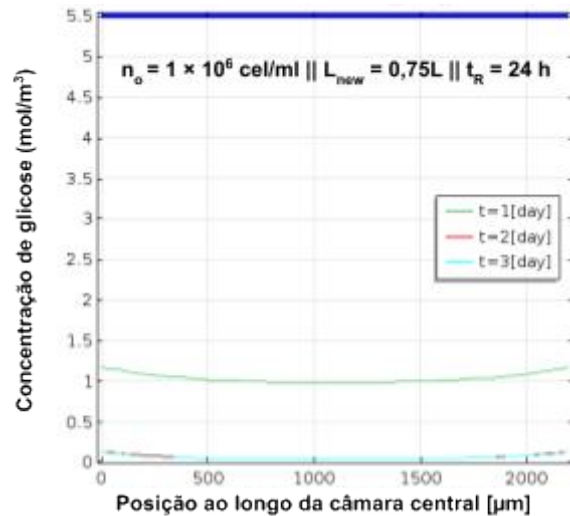


(b)

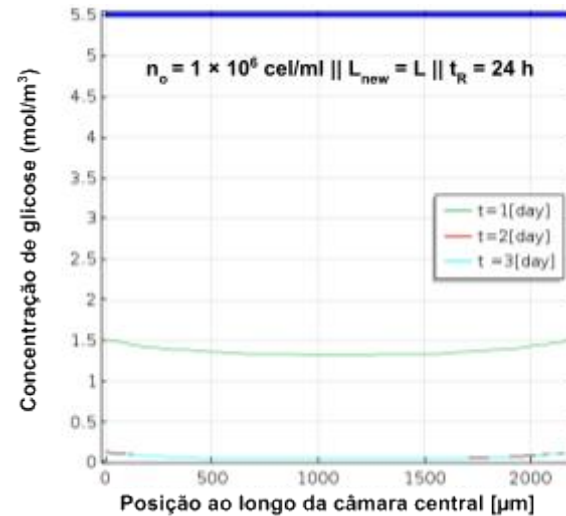


(c)

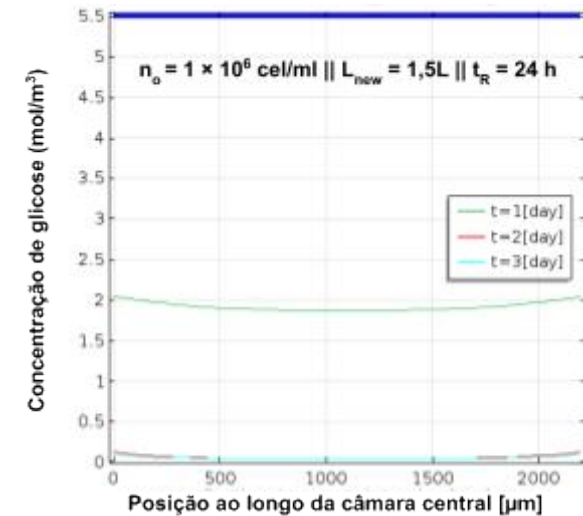
Figura 5.34 - Concentração de células no interior da câmara central para o Caso 03 – $n_o = 1 \times 10^6 \text{ cel/ml}$ (a) 0.75 L (b) L (c) 1.5 L. A linha azul indica a concentração inicial de células.



(a)

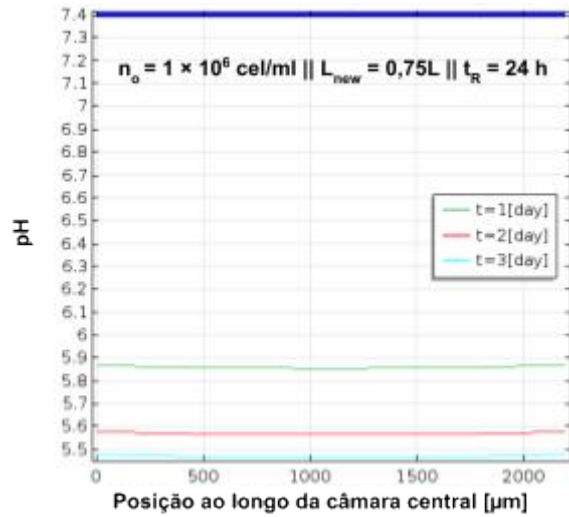


(b)

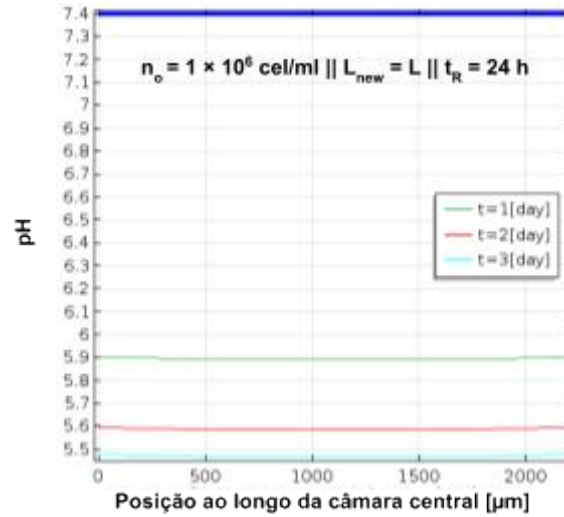


(c)

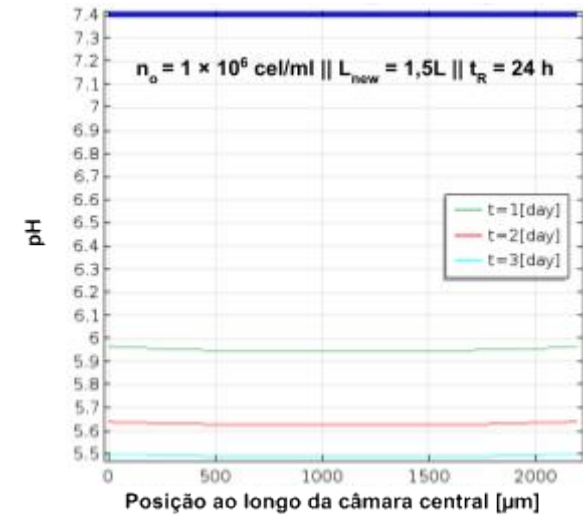
Figura 5.35 - Concentração de glicose no interior da câmara central para o Caso 03 – $n_o = 1 \times 10^6 \text{ cel/ml}$ (a) 0.75 L (b) L (c) 1.5 L. A linha azul indica a concentração inicial de glicose.



(a)

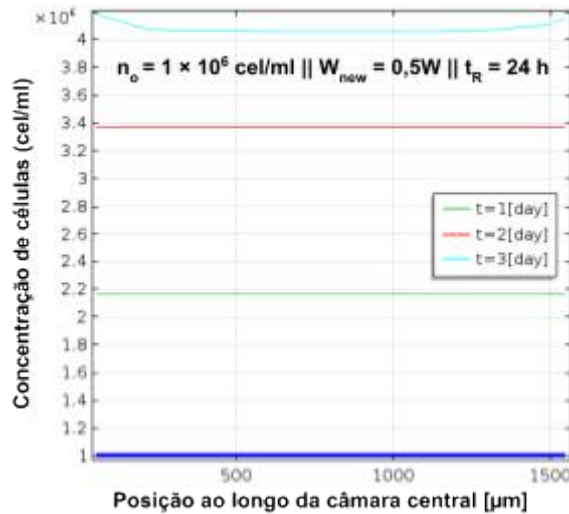


(b)

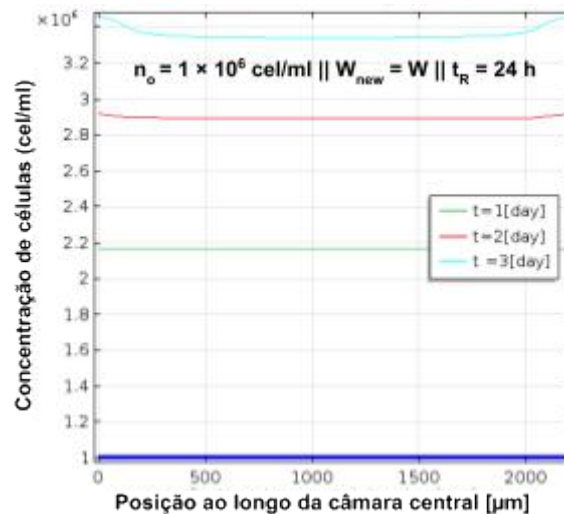


(c)

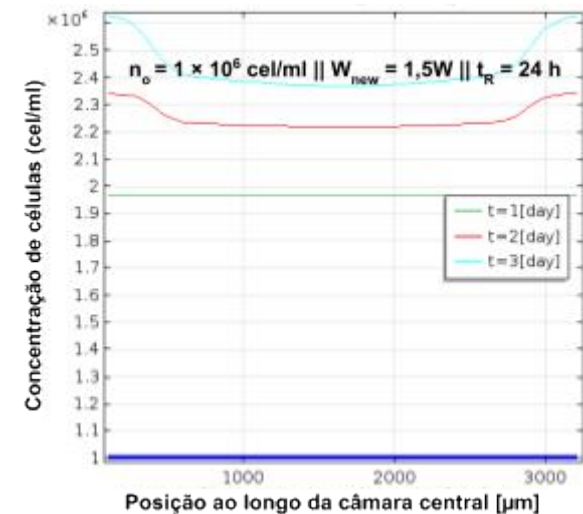
Figura 5.36 - pH no interior da câmara central para o Caso 03 – $n_o = 1 \times 10^6 \text{ cel/ml}$ (a) 0.75 L (b) L (c) 1.5 L. A linha azul indica pH inicial.



(a)

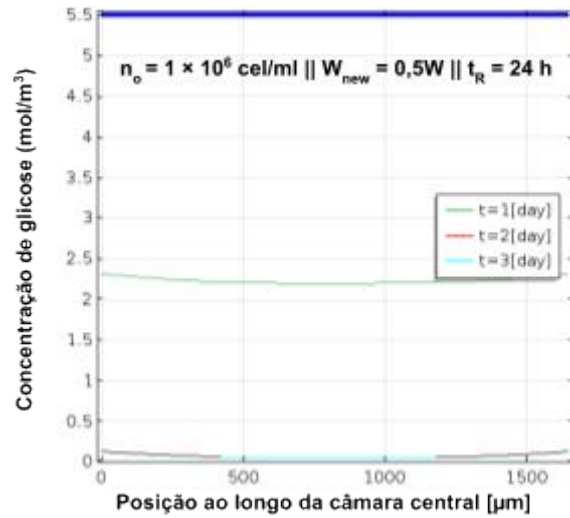


(b)

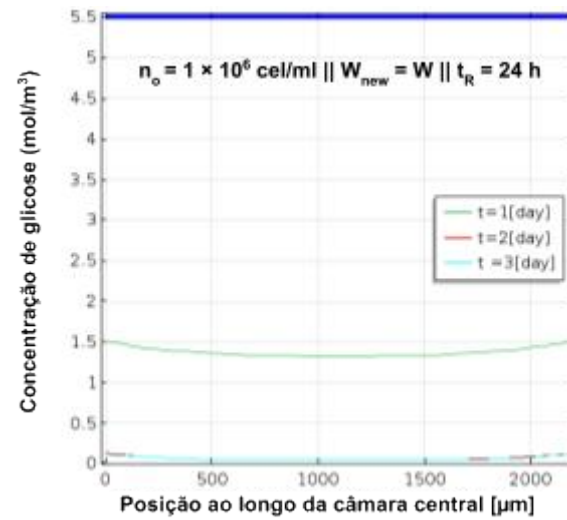


(c)

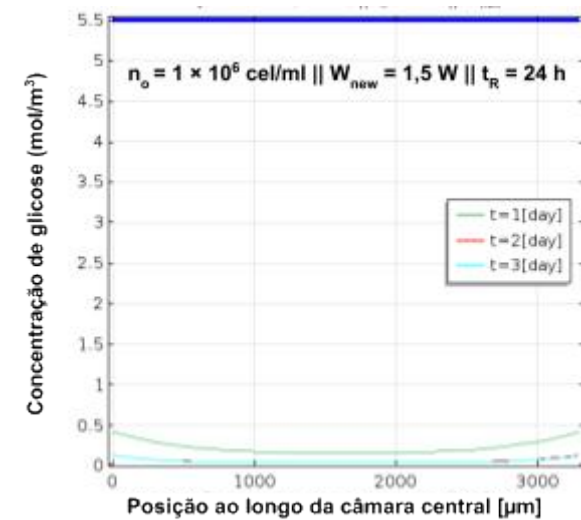
Figura 5.37 - Concentração de células no interior da câmara central para o Caso 03 – $n_o = 1 \times 10^6 \text{ cel/ml}$ (a) 0.5 W (b) W (c) 1.5 W. A linha azul indica a concentração inicial de células.



(a)

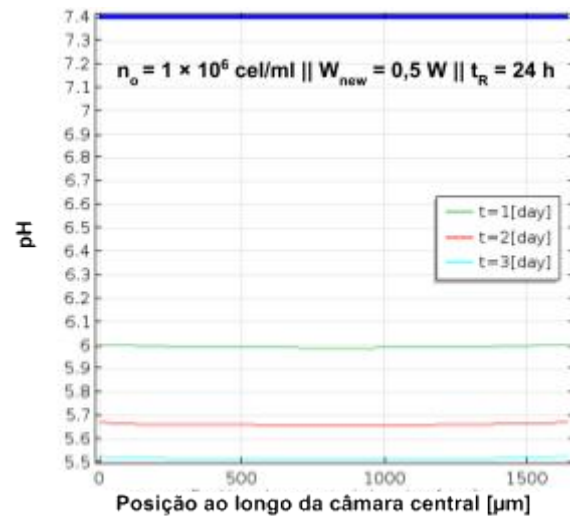


(b)

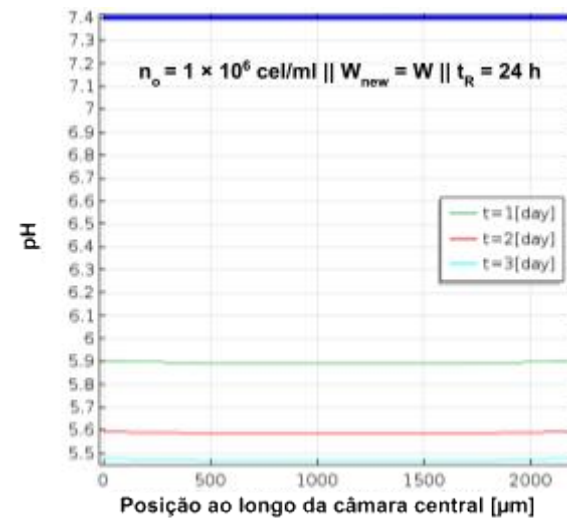


(c)

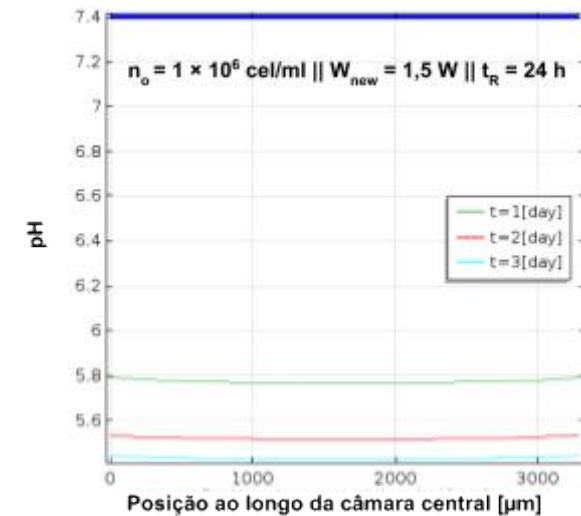
Figura 5.38 - Concentração de glicose no interior da câmara central para o Caso 03 – $n_o = 1 \times 10^6 \text{ cel/ml}$ (a) 0.5 W (b) W (c) 1.5 W. A linha azul indica a concentração inicial de glicose.



(a)



(b)



(c)

Figura 5.39 - pH no interior da câmara central para o Caso 03 – $n_o = 1 \times 10^6 \text{ cel/ml}$ (a) 0.5 W (b) W (c) 1.5 W. A linha azul indica pH inicial.

5.4.4. Caso 04 - Variação do pg

Para avaliar a variação do parâmetro pg foi considerado um modelo com $n_0 = 1 \times 10^6$ cel/ml, renovação a cada 24 h, $pg = 1$ e $pg = 5$. O pg indica que a taxa de consumo de glicose é aumentada e, conforme reporta a literatura (SHAMSI et al. 2018), denota a agressividade do tumor. Dessa forma, a maior a taxa de consumo de nutrientes pelas células tumorais resulta em menor quantidade nutrientes disponíveis para as células saudáveis. Ademais, a alteração metabólica pelas células tumorais está associada a uma maior produção de ácido. Essas características, dentre outras citadas anteriormente, conferem vantagens importantes para a proliferação e metástase do câncer.

Na Figura 5.40 é apresentada a densidade celular no interior da câmara central para os valores de pg considerados. Para $pg = 1$ verifica-se que as células tumorais proliferam ao longo do tempo de análise, isto é, para o período de três dias. O ambiente favorável do ponto de vista de disponibilidade nutrientes (Fig. 5.41a) e acidez do microambiente (Fig. 5.42a) resulta numa taxa de crescimento do tumor, ou seja, a proliferação supera a mortalidade celular. Ao contrário, para $pg = 5$ observa-se que já no primeiro dia a taxa de mortalidade foi superior à proliferação sendo, portanto, preponderante. Isso é corroborado pelo gráfico da Fig. 5.42b que mostra o ambiente inóspito tanto para as células saudáveis quanto para as células tumorais.

O microambiente tumoral para o caso $pg = 5$ apresenta pH cerca de 30 % menor do que o caso em que $pg = 1$. Na Figura 5.42 é mostrado que a diferença é cerca de 1,3 após o primeiro dia e cerca de 1,1 para os demais dias. É importante ressaltar que a redução de uma unidade no pH representa um ambiente com concentração 10 vezes maior de íons H^+ .

Para uma cultura de células tumorais mais agressivas, com $pg > 1$ recomenda-se a utilização de regimes de renovação mais frequentes. Para o regime de renovação de 24 h observa-se um ambiente ácido e, portanto, elevada taxa de mortalidade, atingindo cerca de 60 % de morte após um período de 3 dias. Observa-se que o modelo é sensível à variação do pg , ou seja, uma pequena variação no valor de pg produz resultados bastante diferentes em termos da densidade celular, formação do núcleo necrótico, acidez do microambiente e distribuição de nutrientes e oxigênio.

Shamsi et al. (2018) considerou a angiogênese em seu modelo, ou seja, a formação de novos vasos sanguíneos a partir de vasos pré-existentes, com a produção de um fator de crescimento (VEGF) secretado pelas células tumorais. Neste caso, os vasos sanguíneos próximos dos tumores fornecem nutrientes e oxigênio e transportam os íons H^+

continuamente, favorecendo a formação de um ambiente favorável para o crescimento e metástase do câncer. De maneira oposta ocorre nos modelos apresentados aqui, ou seja, as simulações apresentadas neste trabalho tem como objetivo representar possíveis configurações experimentais que não contemplam escoamento contínuo através dos canais laterais.

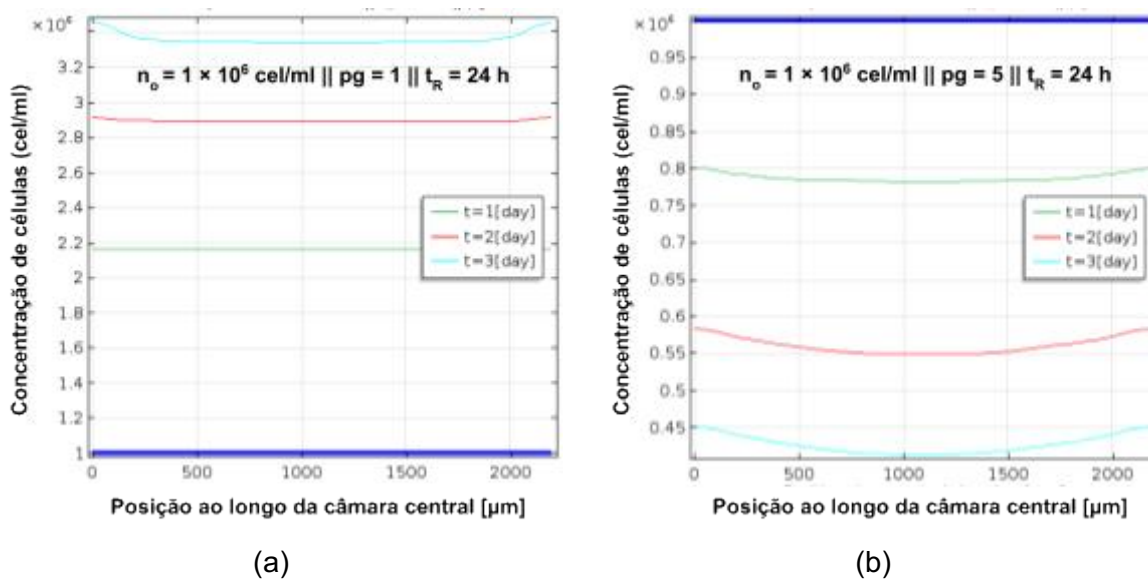


Figura 5.40- Densidade celular no interior da câmara central para (a) $pg = 1$ (b) $pg = 5$. A linha azul indica concentração inicial de células.

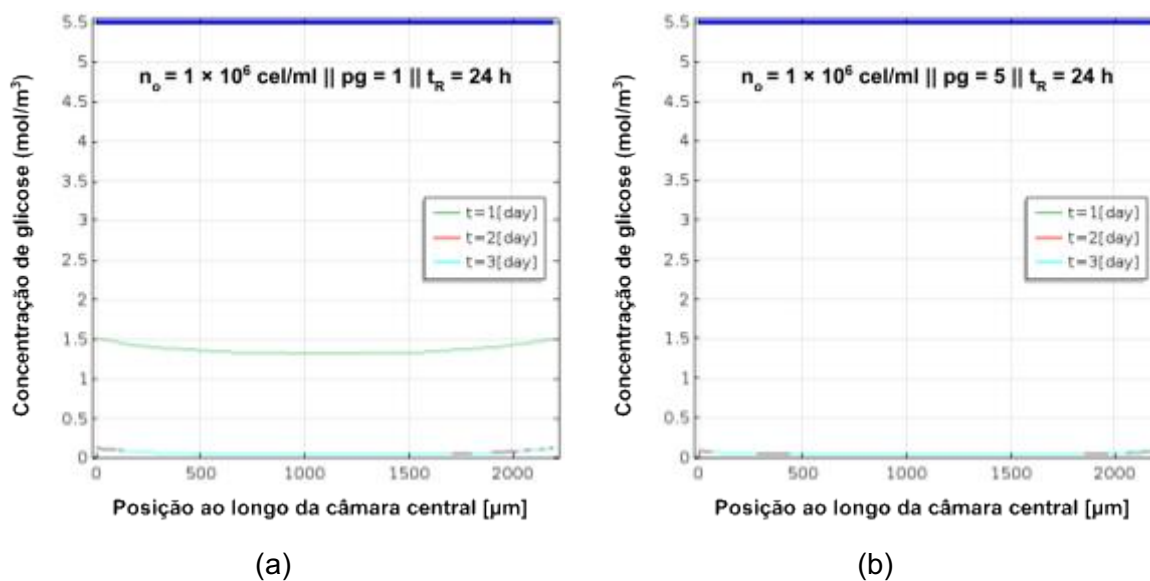


Figura 5.41 - Campo de concentração de glicose no interior da câmara central para (a) $pg = 1$ (b) $pg = 5$. A linha azul indica concentração inicial de glicose.

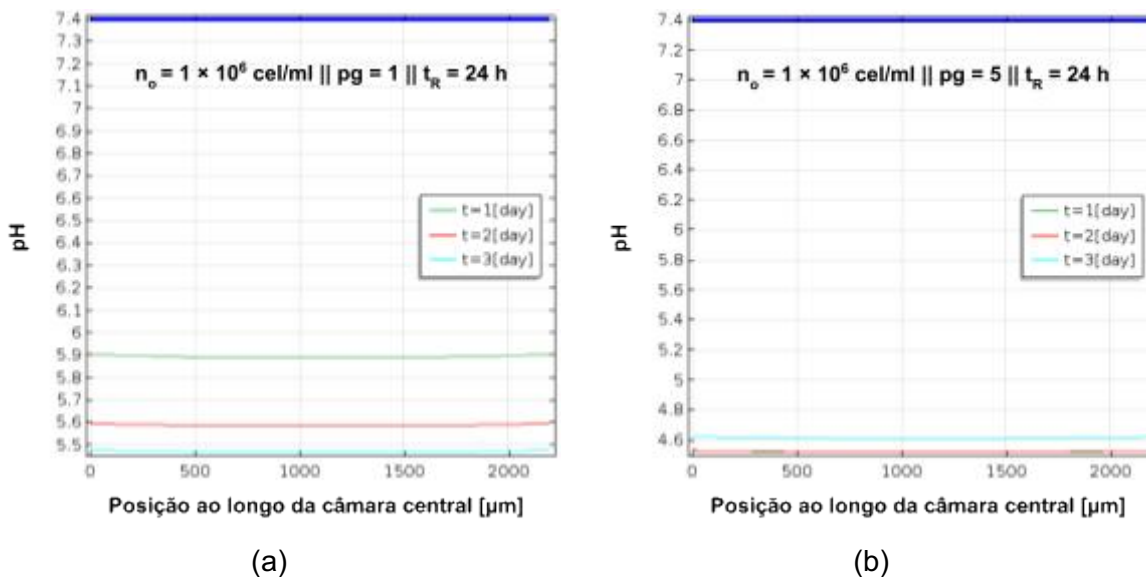


Figura 5.42 - pH no interior da câmara central para (a) $pg = 1$ (b) $pg = 5$. A linha azul indica pH inicial.

5.4.5. Caso 05 - escoamento contínuo por 30 min

Para fins de análise, foi considerado um caso de escoamento constante na entrada dos canais laterais por um período de tempo de 30 minutos a cada 24 h. A simulação foi realizada por 3 dias similar aos casos anteriores. Este caso foi conduzido para avaliar a influência do escoamento do meio de cultura por um tempo maior sobre as células tumorais no interior da câmara central. Para isso foi considerada a máxima densidade inicial de células, isto é, $n_0 = 40 \times 10^6 \text{ cel/ml}$, pois foi a que apresentou a formação do núcleo necrótico evidente após o terceiro dia.

Do ponto de vista experimental, para promover o escoamento contínuo por longos períodos de tempo no dispositivo de microfluídica é necessário o auxílio de algum equipamento extra para isso, como, por exemplo, microbombas que permitem controlar o escoamento. Foi utilizado como base para os estudos deste trabalho um dispositivo de microfluídica que pode ser usado sem a necessidade de escoamento constante. O escoamento considerado nos estudos anteriores referem-se à vazão do meio de cultura, por exemplo, que está contido na pipeta.

A densidade celular aumenta no decorrer do tempo, conforme mostrado na Fig. 5.43. Após o primeiro dia verifica-se um aumento uniforme de cerca de 80 % na concentração celular ao longo da câmara central. Após o segundo e terceiro dia observa-se um aumento na densidade celular, contudo, este aumento ocorre acentuadamente próximo

dos canais laterais (Fig. 5.43). Esse aumento na concentração celular não é observado para o caso 1 (Fig. 5.27) na qual a formação do núcleo necrótico se dá no primeiro dia de análise.

O maior período de tempo de escoamento através dos canais laterais promove um ambiente favorável à proliferação celular devido à disponibilidade de nutrientes conforme ilustrado na Fig. 5.44. Mesmo para regimes de renovação a cada 6 h (vide caso 1) isso não é observado (Fig. 5.29), na qual a disponibilidade de nutrientes ao final dos dias 1, 2 e 3 era praticamente nula.

O aumento da densidade celular próximo dos canais laterais implica na restrição do transporte de moléculas para a região central da câmara central, isto é, o núcleo do tumor (Fig. 5.44). Ademais, maior é o consumo de nutrientes próximo dos canais laterais em decorrência da elevada densidade celular nesta região. Isso corrobora com o fato da região central não apresentar aumento na concentração de células após o segundo dia.

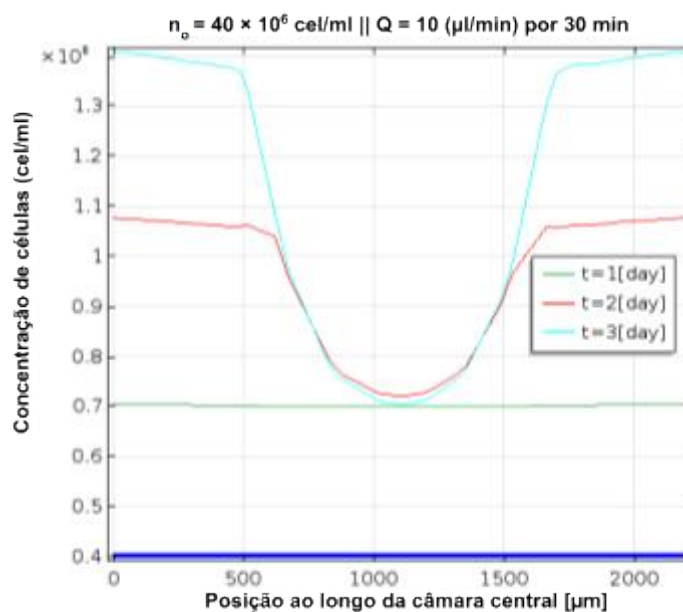


Figura 5.43 – Concentração de células no interior da câmara central para o Caso 5 – $n_0 = 40 \times 10^6$ cel/ml e escoamento constante durante 30 min a cada 24 h. A linha azul indica a concentração inicial de células.

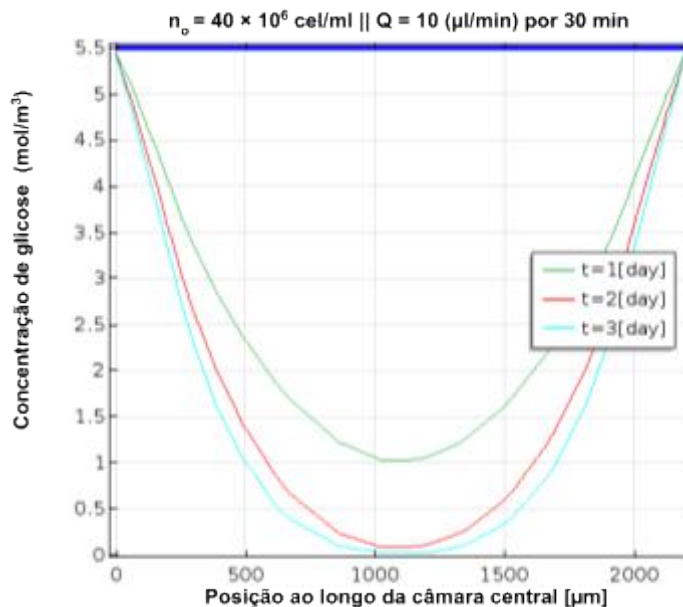


Figura 5.44 – Concentração de glicose no interior da câmara central para o Caso 5 – $n_0 = 40 \times 10^6$ cel/ml e escoamento constante durante 30 min a cada 24 h. A linha azul indica a concentração inicial de glicose.

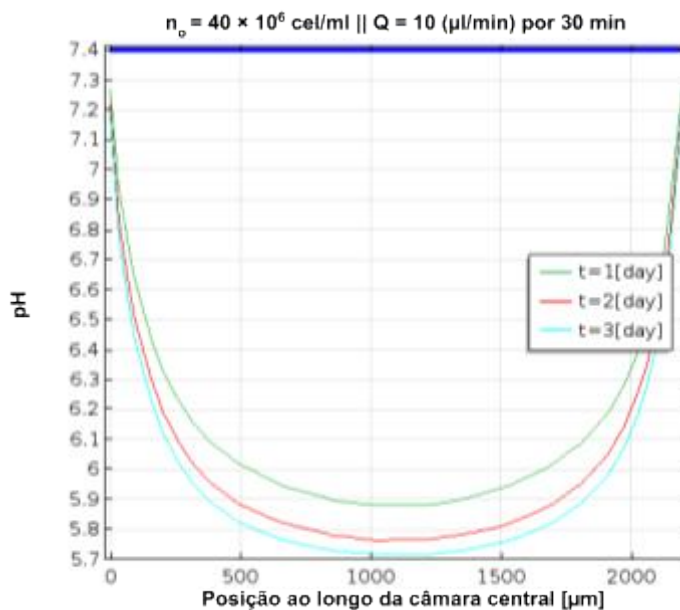


Figura 5.45 – pH no interior da câmara central para o Caso 5 – $n_0 = 40 \times 10^6$ cel/ml e escoamento constante durante 30 min a cada 24 h. A linha azul indica pH inicial.

5.5. Considerações e Limitações dos modelos

Há uma enorme variação na gama dos parâmetros encontrados na literatura, às vezes com intervalos cobrindo várias ordens de magnitude, o que torna muito difícil obter

uma precisão razoável ao modelar testes experimentais. Essa variabilidade pode ser resultado da alta heterogeneidade e da alta capacidade adaptativa das células tumorais.

Para o desenvolvimento dos modelos apresentados neste trabalho foram consideradas algumas hipóteses simplificadoras como, por exemplo, em relação à taxa de consumo de nutrientes. As taxas de consumo de nutrientes e O_2 são diferentes para as células no estado proliferativo e no estado quiescente. No entanto, não foi contemplada essa diferença nos modelos apresentados, tendo em vista os pequenos tempos de análise.

Outra consideração adotada é que a câmara central é preenchida somente por células tumorais e, não considera a interação com células normais. Ademais, a produção de ácido pelas células tumorais está relacionada com a produção de enzimas que degradam a matriz extracelular (CHAPLAIN; ANDERSON, 2004). A degradação da matriz extracelular deverá alterar o campo de concentração das moléculas (glicose, O_2 e H^+). Além disso, esse fenômeno influencia a mobilidade das células (KIHARA; ITO; MIYAKE, 2013; SHAMSI et al. 2018; SUHAIMI; WARD; DAS, 2021). No entanto, o modelo não considera a degradação da matriz extracelular. Contudo, para pequenos tempos de análise (3 dias) esses fatores não deverão alterar significativamente os resultados.

Os cânceres geralmente têm metabolismo alterado (ANNIBALDI; WIDMANN, 2010), o que envolve consumo excessivo de glicose e produção de ácido, que leva à acidificação do microambiente tumoral (SHAMSI et al. 2018; ROBERTSON-TESSI et al., 2015). As células cancerígenas são melhor adaptadas às condições ácidas do que as células normais e, portanto, elas podem danificar e invadir tecidos normais (PATEL et al., 2001). A possibilidade de estudar o comportamento das células tumorais em dispositivos de microfluídica por meio de uma abordagem computacional abordando diversos aspectos dessa heterogeneidade do microambiente representa uma vantagem para futuros ajustes experimentais.

Os modelos apresentados permitem estudar sistemas baseados em microfluídica sem a necessidade de possuir componentes físicos, entender os processos envolvidos em diversos fenômenos biológicos bem como prever os fatores importantes, visando a otimização durante a implementação experimental desses sistemas. Os modelos permitem reproduzir sistemas físicos complexos, sem as dificuldades características das abordagens experimentais. No computador usado descrito na seção 3.2 o tempo médio de simulação para os modelos bidimensionais sem célula foi de aproximadamente 10 min e para os modelos tridimensionais com células cerca de 3 h.

CAPÍTULO VI

CONCLUSÃO

Este trabalho avaliou, por meio de uma abordagem *in silico*, a distribuição espaço-temporal da glicose, oxigênio e resíduos metabólicos (íons de H^+) e sua influência sobre o comportamento de células tumorais em um dispositivo de microfluídica destinado a análises biológicas, em que seu uso foi reportado na literatura em experimentos envolvendo células tumorais.

As análises foram desenvolvidas por meio de simulações computacionais pelo método dos elementos finitos considerando uma abordagem sem células, na qual foi avaliada a distribuição de nutrientes no interior do dispositivo levando em conta, dentre outros, alterações nas propriedades da matriz porosa. Na sequência, uma abordagem com células foi considerada e, para isso, foram desenvolvidos modelos matemáticos para avaliar como a distribuição dessas substâncias influenciam o comportamento da proliferação e morte das células tumorais.

Dessa forma, levando-se em consideração as metodologias propostas neste trabalho, as principais conclusões são:

- A distribuição espaço-temporal de glicose no interior da câmara central após cessar o escoamento do meio de cultura nos canais laterais não é influenciada de forma significativa pela variação da vazão inicial à qual é depositada o meio de cultura. Isso se dá devido à resistência do hidrogel imerso na câmara central e ao baixo

tempo em que ocorre o escoamento do meio de cultura nos canais laterais, pois após cessar o escoamento o mecanismo de transporte predominante é a difusão.

- A diminuição da porosidade e, conseqüentemente o aumento da tortuosidade, tem um efeito relevante na redução efetiva da difusão mássica, ou seja, a resistência ao transporte de massa por difusão é, portanto, mais significativo.
- Para os casos analisados em que o escoamento se dá nos canais laterais durante um curto período de tempo a influência da permeabilidade no gradiente de concentração não é significativa.
- Os resultados obtidos da distribuição de substâncias no interior dos dispositivos de microfluídica dos modelos computacionais apresentam uma boa concordância com resultados experimentais com dispositivos similares reportados na literatura.
- Os resultados obtidos por meio da equação preditiva apresentam boa correlação com os resultados obtidos pela utilização do método dos elementos finitos. Assim, este modelo inicial permite estimar o campo de concentração de determinado soluto no interior do dispositivo de microfluídica para várias condições, dentro da faixa de validade, podendo ser usado para auxiliar no planejamento experimental e processos de fabricação de dispositivos similares.
- Os modelos matemáticos do comportamento celular apresentam resultados similares aos resultados obtidos de ensaios experimentais utilizando cultura de células tumorais em dispositivos de microfluídica similares, como, por exemplo, a formação do núcleo necrótico em condições de elevada densidade inicial de células.
- Os modelos possibilitam analisar uma ampla variedade de experimentos biológicos sem as dificuldades de tempo e consumo de reagentes inerentes às investigações experimentais e, portanto, contribui para a economia de tempo, custo e esforços associados aos experimentos.
- As abordagens de modelagem e simulação baseadas em computador apresentadas neste trabalho podem produzir previsões ou extrapolações que correspondam aos resultados experimentais;
- Os modelos de simulação desenvolvidos são capazes de auxiliar na identificação de processos ou funções ausentes em um sistema bem como melhorar a compreensão da visualização de processos complexos. Além disso, podem facilitar a consolidação de dados quantitativos.

Conclusão geral

Os modelos propostos neste trabalho permitem avaliar como ocorre a distribuição de glicose, oxigênio e íons de H^+ no interior de um dispositivo de microfluídica e, como estes parâmetros influenciam no comportamento da proliferação e morte celular. Dessa forma, eses modelos se apresentam como ferramentas importantes para o planejamento e otimização de experimentos de cultura de células tumorais em dispositivos de microfluídica.

Sugestões para trabalhos futuros.

Adotando o modelo apresentado como ponto de partida, ainda há espaço para desenvolvimento e continuação deste trabalho e, assim, sugere-se como atividades futuras:

- Utilização dos modelos propostos neste trabalho para auxiliar nos ajustes experimentais envolvendo sistemas de microfluídica, de forma particular do grupo de pesquisa Gbio² da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.
- Incluir nos modelos a produção de fatores de crescimento (VEGF) responsáveis pela angiogênese, etapa importante na metástase.
- Incluir o efeito da degradação da matriz extracelular que influencia na migração celular e na distribuição de substâncias no interior dos dispositivos de microfluídica.
- Avaliar e incluir nos modelos os efeitos da temperatura sobre os fenômenos envolvidos no comportamento das células tumorais.
- Estudar o padrão espaço-temporal de fármacos no interior dos dispositivos de microfluídica e como estes influenciam o comportamento das células tumorais.
- Considerar a presença de células normais e suas interações com as células tumorais nos modelos.

CAPÍTULO VII

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABHYANKAR, V. V.; LOKUTA, M. A.; HUTTENLOCHER, A.; BEEBE, D. J. Characterization of a membrane-based gradient generator for use in cell-signaling studies. **Lab on a Chip**, [s. l.], v. 6, n. 3, p. 389–393, 2006. <http://xlink.rsc.org/?DOI=b514133h>

AMO, C. Del; BORAU, C.; GUTIÉRREZ, R.; ASÍN, J.; GARCÍA-AZNAR, J. M. Quantification of angiogenic sprouting under different growth factors in a microfluidic platform. **Journal of Biomechanics**, [s. l.], v. 49, n. 8, p. 1340–1346, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiomech.2015.10.026>

ANNIBALDI, A.; WIDMANN, C. Glucose metabolism in cancer cells. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, [s. l.], v. 13, n. 4, p. 466–470, 2010. <http://dx.doi.org/10.1097/mco.0b013e32833a5577>

ATENCIA, J.; COOKSEY, G. A.; LOCASCIO, L. E. A robust diffusion-based gradient generator for dynamic cell assays. **Lab on a Chip**, [s. l.], v. 12, n. 2, p. 309–316, 2012. <http://dx.doi.org/10.1039/c1lc20829b>.

AYENSA-JIMÉNEZ, J.; PÉREZ-ALIACAR, M.; RANDELOVIC, T.; OLIVÁN, S.; FERNÁNDEZ, L.; SANZ-HERRERA, J. A.; OCHOA, I.; DOWEIDAR, M. H.; DOBLARÉ, M. Mathematical formulation and parametric analysis of in vitro cell models in microfluidic

devices: application to different stages of glioblastoma evolution. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 21193, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-78215-3>

AYUSO, J. M.; VIRUMBRALES-MUÑOZ, M.; LACUEVA, A.; LANUZA, P. M.; CHECA-CHAVARRIA, E.; BOTELLA, P.; FERNÁNDEZ, E.; DOBLARE, M.; ALLISON, S. J.; PHILLIPS, R. M.; PARDO, J.; FERNANDEZ, L. J.; OCHOA, I. Development and characterization of a microfluidic model of the tumour microenvironment. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 36086, 2016. <http://dx.doi.org/10.1038/srep36086>

BEEBE, D. J.; MENSING, G. A.; WALKER, G. M. Physics and Applications of Microfluidics in Biology. **Annual Review of Biomedical Engineering**, [s. l.], v. 4, n. 1, p. 261–286, 2002. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.bioeng.4.112601.125916>

BENZEKRY, S.; LAMONT, C.; BEHESHTI, A.; TRACZ, A.; EBOS, J. M. L.; HLATKY, L.; HAHNFELDT, P. Classical Mathematical Models for Description and Prediction of Experimental Tumor Growth. **PLoS Computational Biology**, [s. l.], v. 10, n. 8, p. e1003800, 2014. <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pcbi.1003800>

BHATIA, S. N.; INGBER, D. E. Microfluidic organs-on-chips. **Nature Biotechnology**, [s. l.], v. 32, n. 8, p. 760–772, 2014. <http://dx.doi.org/10.1038/nbt.2989>

BONIFÁCIO, E. D.; GONZÁLEZ-TORRES, L. A.; MEIRELES, A. B.; GUIMARÃES, M. V.; ARAUJO, C. A. Spatiotemporal pattern of glucose in a microfluidic device depend on the porosity and permeability of the medium: A finite element study. **Computer Methods and Programs in Biomedicine**, [s. l.], v. 182, p. 105039, 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmpb.2019.105039>

BORAU, C.; KAMM, R. D.; GARCÍA-AZNAR, J. M. Mechano-sensing and cell migration: a 3D model approach. **Physical Biology**, [s. l.], v. 8, n. 6, p. 066008–066013, 2011. <http://dx.doi.org/10.1088/1478-3975/8/6/066008>

BOUSSOMMIER-CALLEJA, A.; LI, R.; CHEN, M. B.; WONG, S. C.; KAMM, R. D. Microfluidics: A New Tool for Modeling Cancer–Immune Interactions. **Trends in Cancer**, [s. l.], v. 2, n. 1, p. 6–19, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.trecan.2015.12.003>

BRADY, R.; ENDERLING, H. Mathematical Models of Cancer: When to Predict Novel Therapies, and When Not to. **Bulletin of Mathematical Biology**, [s. l.], v. 81, n. 10, p. 3722–3731, 2019. <https://doi.org/10.1007/s11538-019-00640-x>

BULL, J. A.; MECH, F.; QUAISER, T.; WATERS, S. L.; BYRNE, H. M. Mathematical modelling reveals cellular dynamics within tumour spheroids. **PLoS Computational Biology**, [s. l.], v. 16, n. 8, p. 1–25, 2020. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pcbi.1007961>

CABALLERO, D.; KAUSHIK, S.; CORRELO, V. M.; OLIVEIRA, J. M.; REIS, R. L.; KUNDU, S. C. Organ-on-chip models of cancer metastasis for future personalized medicine: From chip to the patient. **Biomaterials**, [s. l.], v. 149, p. 98–115, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.10.005>

CASCIARI, J. J.; SOTIRCHOS, S. V.; SUTHERLAND, R. M. Glucose Diffusivity in Multicellular Tumor Spheroids. **Cancer Research**, [s. l.], v. 48, n. 14, p. 3905–3909, 1988. PMID: 3383189

CASCIARI, J. J.; SOTIRCHOS, S. V.; SUTHERLAND, R. M. Mathematical modelling of microenvironment and growth in EMT6/Ro multicellular tumour spheroids. **Cell Proliferation**, [s. l.], v. 25, n. 1, p. 1–22, 1992. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2184.1992.tb01433.x>

CHOI, J.; SONG, H.; SUNG, J. H.; KIM, D.; KIM, K. Microfluidic assay-based optical measurement techniques for cell analysis: A review of recent progress. **Biosensors and Bioelectronics**, [s. l.], v. 77, p. 227–236, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2015.07.068>

CHOI, Y.; HYUN, E.; SEO, J.; BLUNDELL, C.; KIM, H. C.; LEE, E.; LEE, S. H.; MOON, A.; MOON, W. K.; HUH, D. A microengineered pathophysiological model of early-stage breast cancer. **Lab on a Chip**, [s. l.], v. 15, n. 16, p. 3350–3357, 2015. <http://dx.doi.org/10.1039/C5LC00514K>

CHUNG, B. G.; CHOO, J. Microfluidic gradient platforms for controlling cellular behavior. **Electrophoresis**, [s. l.], v. 31, n. 18, p. 3014–3027, 2010. <http://dx.doi.org/10.1002/elps.201000137>

COLUCCIO, M. L.; PEROZZIELLO, G.; MALARA, N.; PARROTTA, E.; ZHANG, P.; GENTILE, F.; LIMONGI, T.; RAJ, P. M.; CUDA, G.; CANDELORO, P.; DI FABRIZIO, E. Microfluidic platforms for cell cultures and investigations. **Microelectronic Engineering**, [s. l.], v. 208, n. June 2018, p. 14–28, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.mee.2019.01.004>

CÓNDOR, M.; RÜBERG, T.; BORAU, C.; PILES, J.; GARCÍA-AZNAR, J. M. A web-based application for automated quantification of chemical gradients induced in microfluidic devices. **Computers in Biology and Medicine**, [s. l.], v. 95, p. 118–128, 2018. <http://dx.doi.org/10.1016/j.compbiomed.2018.02.001>

DERTINGER, S. K. W.; CHIU, D. T.; NOO LI JEON; WHITESIDES, G. M. Generation of gradients having complex shapes using microfluidic networks. **Analytical Chemistry**, [s. l.], v. 73, n. 6, p. 1240–1246, 2001. <http://dx.doi.org/10.1021/ac001132d>

DHUMPA, R.; ROPER, M. G. Temporal gradients in microfluidic systems to probe cellular dynamics: A review. **Analytica Chimica Acta**, [s. l.], v. 743, p. 9–18, 2012. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2012.07.006>

EINSTEIN, A. Über die von der molekularkinetischen Theorie der Wärme geforderte Bewegung von in ruhenden Flüssigkeiten suspendierten Teilchen. **Annalen der Physik**, [s. l.], v. 322, n. 8, p. 549–560, 1905. <http://doi.wiley.com/10.1002/andp.19053220806>

EL-ALI, J.; SORGER, P. K.; JENSEN, K. F. Cells on chips. **Nature**, [s. l.], v. 442, n. 7101, p. 403–411, 2006. <http://dx.doi.org/10.1038/nature05063>.

ESCH, E. W.; BAHINSKI, A.; HUH, D. Organs-on-chips at the frontiers of drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, [s. l.], v. 14, n. 4, p. 248–260, 2015. <http://dx.doi.org/10.1038/nrd4539>

FERNANDES, T. G.; DIOGO, M. M.; CLARK, D. S.; DORDICK, J. S.; CABRAL, J. M. S. High-throughput cellular microarray platforms: applications in drug discovery, toxicology and stem cell research. **Trends in Biotechnology**, [s. l.], v. 27, n. 6, p. 342–349, 2009. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2009.02.009>

FISH, J.; BELYTSCHKO, T. **A First Course in Finite Elements**. 1. ed. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2007. <http://doi.wiley.com/10.1002/9780470510858>

GARCÍA, S.; SUNYER, R.; OLIVARES, A.; NOAILLY, J.; ATENCIA, J.; TREPAT, X. Generation of stable orthogonal gradients of chemical concentration and substrate stiffness in a microfluidic device. **Lab on a Chip**, [s. l.], v. 15, n. 12, p. 2606–2614, 2015. <http://dx.doi.org/10.1039/C5LC00140D>

GATENBY, R. A.; GAWLINSKI, E. T. A reaction-diffusion model of cancer invasion. **Cancer Research**, [s. l.], v. 56, n. 24, p. 5745–5753, 1996. PMID: 8971186

GATENBY, R. A.; SMALLBONE, K.; MAINI, P. K.; ROSE, F.; AVERILL, J.; NAGLE, R. B.; WORRALL, L.; GILLIES, R. J. Cellular adaptations to hypoxia and acidosis during somatic evolution of breast cancer. **British Journal of Cancer**, [s. l.], v. 97, n. 5, p. 646–653, 2007. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.bjc.6603922>

GERLEE, P.; ANDERSON, A. R. A. A hybrid cellular automaton model of clonal evolution in cancer: The emergence of the glycolytic phenotype. **Journal of Theoretical Biology**, [s. l.], v. 250, n. 4, p. 705–722, 2008. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtbi.2007.10.038>

GERMAN, C.; MADIHALLY, S. Applications of Computational Modelling and Simulation of Porous Medium in Tissue Engineering. **Computation**, [s. l.], v. 4, n. 1, p. 1–11, 2016. <https://doi.org/10.3390/computation4010007>

GHANBARIAN, B.; HUNT, A. G.; EWING, R. P.; SAHIMI, M. Tortuosity in Porous Media: A Critical Review. **Soil Science Society of America Journal**, [s. l.], v. 77, n. 5, p. 1461–1477, 2013. <http://dx.doi.org/10.2136/sssaj2012.0435>

GROSS, P. G.; KARTALOV, E. P.; SCHERER, A.; WEINER, L. P. Applications of microfluidics for neuronal studies. **Journal of the Neurological Sciences**, [s. l.], v. 252, n. 2, p. 135–143, 2007. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jns.2006.11.009>

GUPTA, K.; KIM, D.-H.; ELLISON, D.; SMITH, C.; KUNDU, A.; TUAN, J.; SUH, K.-Y.; LEVCHENKO, A. Lab-on-a-chip devices as an emerging platform for stem cell biology. **Lab on a Chip**, [s. l.], v. 10, n. 16, p. 2019, 2010. <http://xlink.rsc.org/?DOI=c004689b>

HEIDEN, M. G. V.; CANTLEY, L. C.; THOMPSON, C. B. Understanding the warburg effect: The metabolic requirements of cell proliferation. **Science**, [s. l.], v. 324, n. 5930, p. 1029–1033, 2009. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1160809>

HU, G.; QUARANTA, V.; LI, D. Modeling of effects of nutrient gradients on cell proliferation in microfluidic bioreactor. **Biotechnology Progress**, [s. l.], v. 23, n. 6, p. 1347–1354, 2007. <http://dx.doi.org/10.1021/bp070234n>

HUANG, M.; FAN, S.; XING, W.; LIU, C. Microfluidic cell culture system studies and computational fluid dynamics. **Mathematical and Computer Modelling**, [s. l.], v. 52, n. 11–12, p. 2036–2042, 2010. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mcm.2010.01.024>

HUH, D.; HAMILTON, G. A.; INGBER, D. E. From Three-Dimensional Cell Culture to Organs-on-Chips. **Trends Cell Biol**, [s. l.], v. 21, n. 12, p. 745–754, 2011. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tcb.2011.09.005>

HUH, D.; KIM, H. J.; FRASER, J. P.; SHEA, D. E.; KHAN, M.; BAHINSKI, A.; HAMILTON, G. A.; INGBER, D. E. Microfabrication of human organs-on-chips. **Nature Protocols**, [s. l.], v. 8, n. 11, p. 2135–2157, 2013. <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2013.137>

IBRAHIM-HASHIM, Arig; ROBERTSON-TESSI, M; ENRIQUEZ-NAVAS, P. M.; DAMAGHI, M.; BALAGURUNATHAN, Y.; WOJTKOWIAK, J. W.; RUSSELL, S.; YOONSEOK, K.; LLOYD, M. C.; BUI, M. M.. Defining Cancer Subpopulations by Adaptive Strategies Rather Than Molecular Properties Provides Novel Insights into Intratumoral Evolution. **Cancer Research**, [S.I.], v. 77, n. 9, p. 2242-2254. <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.can-16-2844>

ISMAGILOV, R. F.; STROOCK, A. D.; KENIS, P. J. A.; WHITESIDES, G.; STONE, H. A.; Experimental and theoretical scaling laws for transverse diffusive broadening in two- phase laminar flows in microchannels. **Applied Physics Letters**, [S.I.], v. 76, n. 17, p. 2376-2378. <http://dx.doi.org/10.1063/1.12635>

JAIN, R. K.. Transport of molecules across tumor vasculature. **Cancer And Metastasis Review**, [S.I.], v. 6, n. 4, p. 559-593. <http://dx.doi.org/10.1007/bf00047468>.

JARRETT, A. M.; LIMA, E. A. B. F.; HORMUTH, D. A.; MCKENNA, M. T.; FENG, X.; EKRUT, D. A.; RESENDE, A. C. M.; BROCK, A.; YANKEELOV, T. E. Mathematical models of tumor cell proliferation: A review of the literature. **Expert Review of Anticancer Therapy**, [s. I.], v. 18, n. 12, p. 1271–1286, 2018. <http://dx.doi.org/10.1080/14737140.2018.1527689>

JEON, N. L.; DERTINGER, S. K. W.; CHIU, D. T.; CHOI, I. S.; STROOCK, A. D.; WHITESIDES, G. M. Generation of solution and surface gradients using microfluidic systems. **Langmuir**, [s. I.], v. 16, n. 22, p. 8311–8316, 2000. <https://doi.org/10.1021/la000600b>

JUNG, H.; CHUN, M.-S.; CHANG, M.-S. Sorting of human mesenchymal stem cells by applying optimally designed microfluidic chip filtration. **The Analyst**, [s. I.], v. 140, n. 4, p. 1265–1274, 2015. <http://dx.doi.org/10.1039/c4an01430h>

KEENAN, T. M.; FOLCH, A. Biomolecular gradients in cell culture systems. **Lab Chip**, [s. I.], v. 8, n. 1, p. 34–57, 2008. <http://xlink.rsc.org/?DOI=B711887B>

KHALED, A.-R. A.; VAFAI, K. The role of porous media in modeling flow and heat transfer in biological tissues. **International Journal of Heat and Mass Transfer**, [s. I.], v. 46, n. 26, p. 4989–5003, 2003 [http://dx.doi.org/10.1016/s0017-9310\(03\)00301-6](http://dx.doi.org/10.1016/s0017-9310(03)00301-6)

KIHARA, T.; ITO, J.; MIYAKE, J. Measurement of biomolecular diffusion in extracellular matrix condensed by fibroblasts using fluorescence correlation spectroscopy. **PLoS ONE**, [s. I.], v. 8, n. 11, 2013. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082382>

KIM, D.; WU, X.; YOUNG, A. T.; HAYNES, C. L. Microfluidics-Based in Vivo Mimetic Systems for the Study of Cellular Biology. **Accounts of Chemical Research**, [s. l.], v. 47, n. 4, p. 1165–1173, 2014. <http://pubs.acs.org/doi/10.1021/ar4002608>

KIM, H. J.; HUH, D.; HAMILTON, G.; INGBER, D. E. Human gut-on-a-chip inhabited by microbial flora that experiences intestinal peristalsis-like motions and flow. **Lab on a Chip**, [s. l.], v. 12, n. 12, p. 2165–2174, 2012. <https://doi.org/10.1039/C2LC40074J>

KIM, S.; KIM, H. J.; JEON, N. L. Biological applications of microfluidic gradient devices. **Integrative Biology**, [s. l.], v. 2, n. 11–12, p. 584–603, 2010. <http://xlink.rsc.org/?DOI=c0ib00055h>

KIRAN, K. L.; JAYACHANDRAN, D.; LAKSHMINARAYANAN, S. Mathematical modelling of avascular tumour growth based on diffusion of nutrients and its validation. **Canadian Journal of Chemical Engineering**, [s. l.], v. 87, n. 5, p. 732–740, 2009. <https://doi.org/10.1002/cjce.20204>

KOHANDEL, M.; KARDAR, M.; MILOSEVIC, M.; SIVALOGANATHAN, S. Dynamics of tumor growth and combination of anti-angiogenic and cytotoxic therapies. **Physics in Medicine and Biology**, [s. l.], v. 52, n. 13, p. 3665–3677, 2007. <http://dx.doi.org/10.1088/0031-9155/52/13/001>

KRESS, H.; PARK, J. G.; MEJEAN, C. O.; FORSTER, J. D.; PARK, J.; WALSE, S. S.; ZHANG, Y.; WU, D.; WEINER, O. D.; FAHMY, T. M.; DUFRESNE, E. R. Cell stimulation with optically manipulated microspheres. **Nature Methods**, [s. l.], v. 6, n. 12, p. 905–909, 2009. <http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.1400>

LAMBERT, A. W.; PATTABIRAMAN, D. R.; WEINBERG, R. A. Emerging Biological Principles of Metastasis. **Cell**, [s. l.], v. 168, n. 4, p. 670–691, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2016.11.037>

LEE, P. J.; HUNG, P. J.; LEE, L. P. An artificial liver sinusoid with a microfluidic endothelial-like barrier for primary hepatocyte culture. **Biotechnology and Bioengineering**, [s. l.], v. 97, n. 5, p. 1340–1346, 2007. <http://dx.doi.org/10.1002/bit.21360>

LEWIS, D. M.; GERECHT, S. Microfluidics and biomaterials to study angiogenesis. **Current Opinion in Chemical Engineering**, [s. l.], v. 11, p. 114–122, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.coche.2016.02.005>

LIBERTI, M. V.; LOCASALE, J. W. The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? **Trends in Biochemical Sciences**, [s. l.], v. 41, n. 3, p. 211–218, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibs.2015.12.001>

LIN, F.; BUTCHER, E. C. T cell chemotaxis in a simple microfluidic device. **Lab Chip** [s. l.], v. 6, n. 11, p. 1462–1469, 2006. Royal Society of Chemistry (RSC) [.http://dx.doi.org/10.1039/b607071j](http://dx.doi.org/10.1039/b607071j) .

LIN, X.; XIAO, Z.; CHEN, T.; LIANG, S. H.; GUO, H.; GANAPATHY, V.; THANGARAJU, M.; PRASAD, P. D.; ANNIBALDI, A.; WIDMANN, C.; LIBERTI, M. V.; LOCASALE, J. W.; HSU, P. P.; SABATINI, D. M.; GATENBY, R. A.; GAWLINSKI, E. T.; HSU, P. P.; SABATINI, D. M. The glycolytic phenotype in carcinogenesis and tumor invasion: Insights through mathematical models. **Trends in Biochemical Sciences**, [s. l.], v. 63, n. 14, p. 211–218, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibs.2015.12.001>

LOLAS, G.; CHAPLAIN, M. A.. Mathematical modelling of cancer invasion of tissue: dynamic heterogeneity. **Networks and Heterogeneous Media**, [s. l.], v. 1, n. 3, p. 399–439, 2006. <http://dx.doi.org/10.3934/nhm.2006.1.399>

MA, H.; XU, H.; QIN, J. Biomimetic tumor microenvironment on a microfluidic platform. **Biomicrofluidics**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 011501, 2013. <http://aip.scitation.org/doi/10.1063/1.4774070>

MAHESH, K.; VAIDYA, S. Microfluidics: A boon for biological research. **Current Science**, [s. l.], v. 112, n. 10, p. 2021–2028, 2017. <http://dx.doi.org/10.18520/cs/v112/i10/2021-2028>

MEHTA, K.; LINDERMAN, J. J. Model-based analysis and design of a microchannel reactor for tissue engineering. **Biotechnology and Bioengineering**, [s. l.], v. 94, n. 3, p. 596–609, 2006. <https://doi.org/10.1002/bit.20857>

MENDOZA-JUEZ, B.; MARTÍNEZ-GONZÁLEZ, A.; CALVO, G. F.; PÉREZ-GARCÍA, V. M. A Mathematical Model for the Glucose-Lactate Metabolism of in Vitro Cancer Cells. **Bulletin of Mathematical Biology**, [s. l.], v. 74, n. 5, p. 1125–1142, 2012 <http://dx.doi.org/10.1007/s11538-011-9711-z>

MENON, N. V.; CHUAH, Y. J.; PHEY, S.; ZHANG, Y.; WU, Y.; CHAN, V.; KANG, Y. Microfluidic Assay To Study the Combinatorial Impact of Substrate Properties on Mesenchymal Stem Cell Migration. **ACS Applied Materials & Interfaces**, [s. l.], v. 7, n. 31, p. 17095–17103, 2015. <http://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsami.5b03753>

MILLET, L. J.; GILLETTE, M. U. New perspectives on neuronal development via microfluidic environments. **Trends in Neurosciences**, [s. l.], v. 35, n. 12, p. 752–761, 2012. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tins.2012.09.001>

MILLINGTON, R. J.; QUIRK, J. P. Permeability of porous solids. **Transactions of the Faraday Society**, [s. l.], v. 57, p. 1200–1207, 1961. <http://dx.doi.org/10.1039/tf9615701200>

MORENO-AROTZENA, O.; MEIER, J.; DEL AMO, C.; GARCÍA-AZNAR, J. Characterization of Fibrin and Collagen Gels for Engineering Wound Healing Models. **Materials**, [s. l.], v. 8, n. 4, p. 1636–1651, 2015. <http://www.mdpi.com/1996-1944/8/4/1636>

NAGARAJU, S.; TRUONG, D.; MOUNEIMNE, G.; NIKKHAH, M. Microfluidic Tumor-Vascular Model to Study Breast Cancer Cell Invasion and Intravasation. **Advanced Healthcare Materials**, [s. l.], v. 7, n. 9, p. 1701257, 2018. <http://doi.wiley.com/10.1002/adhm.201701257>

NAKAO, Y.; KIMURA, H.; SAKAI, Y.; FUJII, T. Bile canaliculi formation by aligning rat primary hepatocytes in a microfluidic device. **Biomicrofluidics**, [s. l.], v. 5, n. 2, p. 1–7, 2011. <http://dx.doi.org/10.1063/1.3580753>

NARASIMHAN, A. **The role of porous medium modeling in biothermofluids**, 2011.

O'BRIEN, F. J.; HARLEY, B. A.; WALLER, M. A.; YANNAS, I. V.; GIBSON, L. J.; PRENDERGAST, P. J. The effect of pore size on permeability and cell attachment in collagen scaffolds for tissue engineering. **Technology and health care : official journal of the European Society for Engineering and Medicine**, [s. l.], v. 15, n. 1, p. 3–17, 2007. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17264409>

OLIVEIRA, A. F.; PELEGATI, V. B.; CARVALHO, H. F.; CESAR, C. L.; BASTOS, R. G.; TORRE, L. G. De. Cultivation of yeast in diffusion-based microfluidic device. **Biochemical Engineering Journal**, [s. l.], v. 105, p. 288–295, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2015.09.015>

ONG, S.-E.; ZHANG, S.; DU, H.; FU, Y. Fundamental principles and applications of microfluidic systems. **Frontiers in Bioscience**, [s. l.], v. 13, n. 13, p. 2757, 2008. <http://www.bioscience.org/2008/v13/af/2883/list.htm>

PATEL, A. A.; GAWLINSKI, E. T.; LEMIEUX, S. K.; GATENBY, R. A. A cellular automaton model of early tumor growth and invasion: The effects of native tissue vascularity and increased anaerobic tumor metabolism. **Journal of Theoretical Biology**, [s. l.], v. 213, n. 3, p. 315–331, 2001. <https://doi.org/10.1006/jtbi.2001.2385>

PEDERSEN, J. A.; BOSCHETTI, F.; SWARTZ, M. A. Effects of extracellular fiber architecture on cell membrane shear stress in a 3D fibrous matrix. **Journal of Biomechanics**, [s. l.], v. 40, n. 7, p. 1484–1492, 2007. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021929006002375>

PLOU, J.; JUSTE-LANAS, Y.; OLIVARES, V.; DEL AMO, C.; BORAU, C.; GARCÍA-AZNAR, J. M. From individual to collective 3D cancer dissemination: roles of collagen concentration and TGF- β . **Scientific Reports**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 12723, 2018. <http://www.nature.com/articles/s41598-018-30683-4>

PODICHETTY, J. T.; BHASKAR, P. R.; SINGARAPU, K.; MADIHALLY, S. V. Multiple approaches to predicting oxygen and glucose consumptions by HepG2 cells on porous scaffolds in an axial-flow bioreactor. **Biotechnology and Bioengineering**, [s. l.], v. 112, n. 2, p. 393–404, 2015. <https://doi.org/10.1002/bit.25355>

PODICHETTY, J. T.; DHANE, D. V.; MADIHALLY, S. V. Dynamics of diffusivity and pressure drop in flow-through and parallel-flow bioreactors during tissue regeneration. **Biotechnology Progress**, [s. l.], v. 28, n. 4, p. 1045–1054, 2012. <https://doi.org/10.1002/btpr.1547>

POLACHECK, W. J.; CHAREST, J. L.; KAMM, R. D. Interstitial flow influences direction of tumor cell migration through competing mechanisms. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 108, n. 27, p. 11115–11120, 2011.a. <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1103581108>

POLACHECK, W. J.; CHAREST, J. L.; KAMM, R. D. Interstitial flow influences direction of tumor cell migration through competing mechanisms. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 108, n. 27, p. 11115–11120, 2011. b. Disponível em: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1103581108>

POLACHECK, W. J.; GERMAN, A. E.; MAMMOTO, A.; INGBER, D. E.; KAMM, R. D. Mechanotransduction of fluid stresses governs 3D cell migration. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**. [s. l.], v. 111, n. 7, p. 2447–2452, 2014. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1316848111>.

POLACHECK, W. J.; LI, R.; UZEL, S. G. M.; KAMM, R. D. Microfluidic platforms for mechanobiology. **Lab on a Chip**, [s. l.], v. 13, n. 12, p. 2252–2267, 2013. <http://xlink.rsc.org/?DOI=c3lc41393d>

PORTILLO-LARA, R.; ANNABI, N. Microengineered cancer-on-a-chip platforms to study the metastatic microenvironment. **Lab on a Chip**, [s. l.], v. 16, n. 21, p. 4063–4081, 2016. <http://xlink.rsc.org/?DOI=C6LC00718J>

RAMANUJAN, S.; PLUEN, A.; MCKEE, T. D.; BROWN, E. B.; BOUCHER, Y.; JAIN, R. K. Diffusion and convection in collagen gels: Implications for transport in the tumor interstitium. **Biophysical Journal**, [s. l.], v. 83, n. 3, p. 1650–1660, 2002. [http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3495\(02\)73933-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3495(02)73933-7)

ROBERTSON-TESSI, M.; GILLIES, R. J.; GATENBY, R. A.; ANDERSON, A. R. A. Impact of Metabolic Heterogeneity on Tumor Growth, Invasion, and Treatment Outcomes. **Cancer Research**, [s. l.], v. 75, n. 8, p. 1567–1579, 2015.: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0031938416312148>

RONIOTIS, A.; MARIAS, K.; SAKKALIS, V.; ZERVAKIS, M. Diffusive modelling of glioma evolution: a review. **Journal of Biomedical Science and Engineering**, [s. l.], v. 03, n. 05, p. 501–508, 2010. <http://dx.doi.org/10.4236/jbise.2010.35070>.

SAADI, W.; RHEE, S. W.; LIN, F.; VAHIDI, B.; CHUNG, B. G.; JEON, N. L. Generation of stable concentration gradients in 2D and 3D environments using a microfluidic ladder chamber. **Biomedical Microdevices**, [s. l.], v. 9, n. 5, p. 627–635, 2007. <http://dx.doi.org/10.1007/s10544-007-9051-9>

SABIR, M.; SHAH, A.; MUHAMMAD, W.; ALI, I.; BASTIAN, P. A mathematical model of tumor hypoxia targeting in cancer treatment and its numerical simulation. **Computers and Mathematics with Applications**, [s. l.], v. 74, n. 12, p. 3250–3259, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.camwa.2017.08.019>

SACKMANN, E. K.; FULTON, A. L.; BEEBE, D. J. The present and future role of microfluidics in biomedical research. **Nature**, [s. l.], v. 507, n. 7491, p. 181–189, 2014. <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nature13118>

SCHOMACK, P. A.; GILLIES, R. J. Contributions of cell metabolism and H⁺ diffusion to the acidic pH of tumors. **Neoplasia**, [s. l.], v. 5, n. 2, p. 135–145, 2003. [https://doi.org/10.1016/S1476-5586\(03\)80005-2](https://doi.org/10.1016/S1476-5586(03)80005-2)

SHAMSI, M.; SAGHAFIAN, M.; DEJAM, M.; SANATI-NEZHAD, A. Mathematical Modeling of the Function of Warburg Effect in Tumor Microenvironment. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 1–13, 2018. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-27303-6>

SMALLBONE, K.; GATENBY, R. A.; MAINI, P. K. Mathematical modelling of tumour acidity. **Journal of Theoretical Biology**, [s. l.], v. 255, n. 1, p. 106–112, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2008.08.002>

SOMAWEERA, H.; IBRAGUIMOV, A.; PAPPAS, D. A review of chemical gradient systems for cell analysis. **Analytica Chimica Acta**, [s. l.], v. 907, n. 1, p. 7–17, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2015.12.008>

SONTHEIMER-PHELPS, A.; HASSELL, B. A.; INGBER, D. E. Modelling cancer in microfluidic human organs-on-chips. **Nature Reviews Cancer**, [s. l.], v. 19, n. 2, p. 65–81, 2019. <http://www.nature.com/articles/s41568-018-0104-6>

SQUIRES, T. M.; QUAKE, S. R. Microfluidics: Fluid physics at the nanoliter scale. **Reviews of Modern Physics**, [s. l.], v. 77, n. 3, p. 977–1026, 2005. <https://doi.org/10.1103/RevModPhys.77.977>

STRAMER, B.; MAYOR, R. Mechanisms and in vivo functions of contact inhibition of locomotion. **Nature reviews. Molecular cell biology**, [s. l.], v. 18, n. 1, p. 43–55, 2017. <http://dx.doi.org/10.1038/nrm.2016.118>

SUHAIMI, H.; DAS, D. B. Glucose diffusivity in cell-seeded tissue engineering scaffolds. **Biotechnology Letters**, [s. l.], v. 38, n. 1, p. 183–190, 2016. <https://doi.org/10.1007/s10529-015-1958-2>

SUHAIMI, H.; WANG, S.; DAS, D. B. Glucose diffusivity in cell culture medium. **Chemical Engineering Journal**, [s. l.], v. 269, p. 323–327, 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cej.2015.01.130>

SUHAIMI, H.; WANG, S.; THORNTON, T.; DAS, D. B. On glucose diffusivity of tissue engineering membranes and scaffolds. **Chemical Engineering Science**, [s. l.], v. 126, p. 244–256, 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ces.2014.12.029>

SUHAIMI, H.; WARD, J. P.; DAS, D. B. On modelling of glucose transport in hollow fibre membrane bioreactor for growing three-dimensional tissue. **Asia-Pacific Journal of Chemical Engineering**, [s. l.], v. 16, n. 1, p. 1–12, 2021. <https://doi.org/10.1002/apj.2565>

SUN, W.; LUO, Z.; LEE, J.; KIM, H.; LEE, K.; TEBON, P.; FENG, Y.; DOKMECI, M. R.; SENGUPTA, S.; KHADEMHOSEINI, A. Organ-on-a-Chip for Cancer and Immune Organs Modeling. **Advanced Healthcare Materials** [s. l.], v. 8, n. 15, p. 1–12, 2019. <http://dx.doi.org/10.1002/adhm.201900754> .

SWARTZ, M. A.; FLEURY, M. E. Interstitial Flow and Its Effects in Soft Tissues. **Annual Review of Biomedical Engineering**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 229–256, 2007. <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.bioeng.9.060906.151850>

TAGHIBAKHSHI, A.; BARISAM, M.; SAIDI, M. S.; KASHANINEJAD, N.; NGUYEN, N. T. Three-dimensional modeling of avascular tumor growth in both static and dynamic culture platforms. **Micromachines**, [s. l.], v. 10, n. 9, 2019. <http://dx.doi.org/10.3390/mi10090580>.

TJIA, J. S.; MOGHE, P. V. Regulation of cell motility on polymer substrates via “dynamic,” cell internalizable, ligand microinterfaces. **Tissue Engineering**, [s. l.], v. 8, n. 2, p. 247–261, 2002. <http://dx.doi.org/10.1089/107632702753725012> .

TOH, A. G. G.; WANG, Z. P.; YANG, C.; NGUYEN, N.-T. Engineering microfluidic concentration gradient generators for biological applications. **Microfluidics and Nanofluidics**, [s. l.], v. 16, n. 1–2, p. 1–18, 2014.: <http://link.springer.com/10.1007/s10404-013-1236-3>

TSAI, H.-F.; TRUBELJA, A.; SHEN, A. Q.; BAO, G. Tumour-on-a-chip: microfluidic models of tumour morphology, growth and microenvironment. **Journal of The Royal Society Interface**, [s. l.], v. 14, n. 131, p. 20170137, 2017. <http://rsif.royalsocietypublishing.org/lookup/doi/10.1098/rsif.2017.0137>

VELNAR, T.; BAILEY, T.; SMRKOLJ, V. The Wound Healing Process: An Overview of the Cellular and Molecular Mechanisms. **Journal of International Medical Research**, [s. l.], v. 37, n. 5, p. 1528–1542, 2009. <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/147323000903700531>

VELVE-CASQUILLAS, G.; LE BERRE, M.; PIEL, M.; TRAN, P. T. Microfluidic tools for cell biological research. **Nano Today**, [s. l.], v. 5, n. 1, p. 28–47, 2010. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1748013209001340>

WALKER, G. M.; SAI, J.; RICHMOND, A.; STREMLER, M.; CHUNG, C. Y.; WIKSWO, J. P. Effects of flow and diffusion on chemotaxis studies in a microfabricated gradient generator. **Lab on a Chip**, [s. l.], v. 5, n. 6, p. 611–618, 2005. <http://xlink.rsc.org/?DOI=b417245k>

WARD; J.P; KING, J. R. Mathematical modelling of avascular-tumour growth. **IMA Journal of Mathematics Applied in Medicine & Biology**, [s. l.], v. 14, p. 39–69, 1997. <https://doi.org/10.1093/imammb/14.1.39>

WEIBEL, D. B.; WHITESIDES, G. M. Applications of microfluidics in chemical biology. **Current Opinion in Chemical Biology**, [s. l.], v. 10, n. 6, p. 584–591, 2006. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2006.10.016>

WHITE, F. M. **Mecânica dos fluidos**. 6.ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2010. 880p.

WHITESIDES, G. M. The origins and the future of microfluidics. **Nature**, [s. l.], v. 442, n. 7101, p. 368–373, 2006. <https://doi.org/10.1038/nature05058>

WU, D. Q.; ZHANG, G. L.; SHEN, C.; ZHAO, Q.; LI, H.; MENG, Q. Evaluation of diffusion in gel entrapment cell culture within hollow fibers. **World Journal of Gastroenterology**, [s. l.], v. 11, n. 11, p. 1599–1604, 2005. <http://dx.doi.org/10.3748/wjg.v11.i11.1599>

WU, J.; HE, Z.; CHEN, Q.; LIN, J. Trends in Analytical Chemistry Biochemical analysis on microfluidic chips. **Trends in Analytical Chemistry**, [s. l.], v. 80, p. 213–231, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2016.03.013>

YANG, Y.; MOTTE, S.; KAUFMAN, L. J. Biomaterials Pore size variable type I collagen gels and their interaction with glioma cells. **Biomaterials** [s. l.], v. 31, p. 5678–5688, 2010. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.03.039> .

ZAHORODNY-BURKE, M.; NEARINGBURG, B.; ELIAS, A. L. Finite element analysis of oxygen transport in microfluidic cell culture devices with varying channel architectures, perfusion rates, and materials. **Chemical Engineering Science**, [s. l.], v. 66, n. 23, p. 6244–6253, 2011. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ces.2011.09.007>

ZHANG, B.; RADISIC, M. Organ-on-a-chip devices advance to market. **Lab on a Chip**, [s. l.], v. 17, n. 14, p. 2395–2420, 2017. <http://dx.doi.org/10.1039/C6LC01554A>