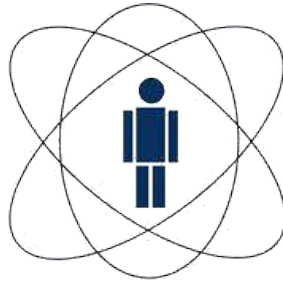


CENTRO BRASILEIRO DE PESQUISAS FÍSICAS
COORDENAÇÃO DE MATÉRIA CONDENSADA, FÍSICA
APLICADA E NANOCIÊNCIA



Fabricação de Microtopografias 3D para Estudos *In Vitro* de Comportamento Celular

Sheila Monteiro Augusto

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física do Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas do Ministério da Ciência Tecnologia e Inovação, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Física.

Orientador: Alexandre Malta Rossi

Rio de Janeiro

Fevereiro de 2023



“FABRICAÇÃO DE MICROTOPOGRAFIAS 3D PARA ESTUDOS IN VITRO DE
COMPORTAMENTO CELULAR”

SHEILA MONTEIRO AUGUSTO

Dissertação de Mestrado em Física apresentada no
Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas do
Ministério da Ciência Tecnologia e Inovação.
Fazendo parte da banca examinadora os seguintes
professores:

Alexandre Malta Rossi – Orientador/CBPF

Fabrício Frizzera Borghi - UFRJ

Alexandre Mello de Paula Silva - CBPF

Rio de Janeiro, 15 de fevereiro de 2023.

Agradecimentos

A minha família, muito obrigada por todo apoio, carinho e por acreditarem nos meus sonhos.

A minha irmã de coração Tatyane Paz, agradeço pela amizade, pelos conselhos, e pelas conversas intermináveis que eu tanto amo.

Ao professor Alexandre Rossi, pela orientação ao longo deste projeto.

Aos professores Fabrício Borghi e Sara Gemini, agradeço imensamente pela ajuda provida durante as dificuldades experimentais. Agradeço também à Carolina Sanz, Elena Mavropoulos e Victor Hugo por conduzirem os experimentos de cultura celular. A ajuda de vocês foi essencial para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao professor Marcos Farina, pelas dicas valiosas relacionadas às análises de microscopia.

Agradeço ao CBPF, e a todos os profissionais dessa instituição por terem me acolhido como aluna de iniciação científica e no programa de mestrado acadêmico.

Por último, agradeço a CAPES pela bolsa de mestrado fornecida.

Resumo

A produção de materiais biocompatíveis eficientes é um dos grandes desafios da medicina regenerativa. Estudos de biomateriais implantados em defeitos ósseos mostram que a topografia e porosidade da superfície de um biomaterial tem influência significativa na regeneração óssea. Entretanto, pouco se conhece sobre a influência desses parâmetros nos processos de mineralização e formação óssea nas escalas micrométrica e sub-micrométrica ($<100\ \mu\text{m}$). As limitações são impostas pela dificuldade de acompanhar os processos *in vivo* de interação das células ósseas com biomateriais implantados. Neste contexto, investigar os processos de mineralização através de experimentos *in vitro* é uma alternativa para se obter informações importantes sobre os processos de mineralização *in vivo*. A motivação para este projeto é desenvolver um protocolo de microfabricação de topografias que possibilite estudos *in vitro* sobre o comportamento celular em topografias que simulam superfícies com microporosidades na escala do tamanho celular ($\sim 20\ \mu\text{m}$). Neste projeto, foram usados um conjunto de técnicas, como *sputtering*, fotolitografia por inscrição direta, fotolitografia por contato, e *soft-lithography*, para fabricar microestruturas tridimensionais com diferentes topografias em silicone biocompatível. Cultura de osteoblastos do fêmur de murino (F-OST) sobre microestruturas compostas por pilares mostraram que as células apresentam maior adesão e viabilidade que as células cultivadas em substrato liso. A topografia mimetizando uma superfície com porosidade influi significativamente na morfologia e crescimento celular. Esses resultados mostram que as microestruturas fabricadas constituem um modelo viável para estudos *in vitro* do comportamento celular em substratos que simulam superfícies com porosidade.

Palavras-chave: microtopografias 3D, microfabricação, cultura celular em microestruturas.

Abstract

The production of efficient biocompatible materials is a major challenge in regenerative medicine. Studies of biomaterials implanted in bone defects show that the topography and porosity of the surface of a biomaterial have a significant influence on bone regeneration. However, little is known about the influence of these parameters on mineralization processes and bone formation at the micrometric and sub-micrometric scales ($<100\ \mu\text{m}$). Limitations are imposed by the difficulty of following *in vivo* processes related to the interaction of bone cells with implanted biomaterials. In this context, investigating mineralization processes through *in vitro* experiments is an alternative to obtain important information about mineralization processes *in vivo*. The motivation for this project is to develop a protocol for the fabrication of microstructures that enables the study of cell behaviour *in vitro* on topographies that simulate surfaces with microporosities on the cell size scale ($\sim 20\ \mu\text{m}$). In this project, a set of techniques, such as sputtering, direct-write photolithography, contact photolithography, and soft-lithography, were used to fabricate three-dimensional microstructures with different topographies on biocompatible silicone. Culture of murine femur osteoblasts (F-OST) on microstructures composed of pillars showed that the cells exhibit higher adhesion and viability than those cultured on flat substrate. The topography simulating a porous surface significantly influences cell morphology and cell growth. These results show that the fabricated microstructures constitute a viable model for *in vitro* studies of cell behavior on substrates simulating porous surfaces.

Keywords: 3D microtopographies, microfabrication, cell culture in microstructures.

Lista de Figuras

4.1	Ilustração do princípio de funcionamento da fotomáscara	7
4.2	Ilustração do processo de fotolitografia por inscrição direta	7
4.3	Ilustração do processo de fotolitografia por contato	8
4.4	Ilustração do processo de <i>spin-coating</i>	9
4.5	Fotoreação do DNQ	9
4.6	Uma das fotomáscaras fabricadas	10
4.7	Ilustração do processo de <i>sputtering</i>	11
4.8	Desenho em CAD dos padrões das fotomáscaras	12
4.9	Padrões distintos da fotomáscara após revelação	13
4.10	Ilustração do processo de inscrição dos padrões da fotomáscara	14
4.11	Padrões danificados devido ao <i>underetching</i>	14
4.12	Padrões distintos da fotomáscara após <i>hard-baking</i>	15
4.13	Ilustração do processo de corrosão do alumínio da fotomáscara	16
4.14	Padrões distintos da fotomáscara após corrosão	17
4.15	Fotomáscara após remoção do resiste	18
4.16	Padrões das fotomáscaras fabricadas	19
4.17	Um dos moldes fabricados	20
4.18	Ilustração do processo de fabricação dos moldes	21
4.19	Padrões dos moldes fabricados	22
4.20	Ilustração do processo de silanização	23
4.21	Ilustração do processo de fabricação das microestruturas em silicone	25
4.22	Topografias em PDMS	26
4.23	Deformação do PDMS na presença de HMDS líquido	27
4.24	Comparação entre estruturas tratadas e não tratadas com HMDS líquido	28
5.1	Cultura celular sobre pilares	29
5.2	Processamento para medida de circularidade	32
5.3	Viabilidade celular 24 h	34
5.4	Ensaio live/dead-24h	35
5.5	Células cultivadas nos substratos lisos e com pilares	36
5.6	Comparação da morfologia das células cultivadas nos substratos lisos e com pilares	37
5.7	Diagrama com a direção dos filopódios sobre os pilares	38
5.8	Análise dos dados morfológicos para diferentes substratos	39
5.9	MEV após 7 dias de cultura celular	40

Sumário

1	Introdução	1
2	Cultura celular em estruturas microfabricadas	3
3	Motivação e objetivos	5
4	Fabricação e caracterização das microestruturas: Métodos e resultados obtidos	6
4.1	Fotolitografia	6
4.2	Fabricação da fotomáscara	10
4.2.1	Inscrição dos padrões na fotomáscara	11
4.2.2	Etapa de corrosão do alumínio	16
4.3	Fabricação dos moldes	20
4.3.1	Funcionalização da superfície moldes	23
4.4	<i>Soft-Lithography</i>	24
4.4.1	Fabricação das estruturas em PDMS	24
4.4.2	Deformação do silicone na presença de HMDS líquido	26
5	Cultura celular em topografia formada por micropilares	29
5.1	Materiais e métodos	29
5.1.1	Cultura celular	29
5.1.2	Ensaio PrestoBlue	30
5.1.3	Ensaio Live/Dead	30
5.1.4	Marcação de actina	30
5.1.5	Processamento de imagens e análises estatísticas	31
5.1.6	Experimento de mineralização celular	32
5.1.7	Processamento das amostras para MEV	33
5.2	Resultados	33
5.2.1	Viabilidade celular	33
5.2.2	Avaliação da morfologia celular	36
5.2.3	Medidas morfológicas	38
5.2.4	MEV mineralização	39
6	Conclusão	41
	Referências	42

1 Introdução

A produção de materiais biocompatíveis eficientes é um dos grandes desafios para o reparo de tecidos acometidos por traumas, fraturas ou doenças. A qualidade de um biomaterial depende das suas características químicas, da topografia da sua superfície e das interações que ele estabelece com tecidos e órgãos no sítio implantado [1,2]. Estes elementos são determinantes para a adesão celular na superfície do biomaterial e para as etapas e processos posteriores que levam à formação do novo tecido [3].

A nível celular, células são constantemente expostas a estímulos mecânicos oriundos da matriz extracelular ou de células vizinhas em contato com substratos biológicos ou sintéticos. A matriz extracelular tem como função prover estrutura para adesão e proliferação celular, além de estímulos bioquímicos e biomecânicos essenciais para os processos de morfogênese, diferenciação celular e homeostase [4,5]. O processo intracelular pelo qual esses estímulos mecânicos são transformados em respostas bioquímicas é chamado de mecanotransdução, e é de fundamental importância para que as células se adaptem às mudanças do ambiente extracelular [6].

A fim de garantir homeostase adequada, as células identificam as propriedades físico-químicas e estruturais do meio para produzir nova matriz com as propriedades similares [7]. As propriedades mecânicas da matriz, como tensão e topografia, controlam processos celulares como proliferação, migração e diferenciação [8,9]. Prover os biomateriais de características estruturais e topográficas que promovam estes eventos celulares é um dos grandes desafios da bioengenharia tecidual.

No campo da bioengenharia óssea, a caracterização dos processos *in vivo* de interação de células ósseas com a superfície de implantes tem sido um dos grandes desafios para o desenvolvimento de materiais ósseo-condutores eficientes para ortopedia e odontologia. Estudos recentes de biomateriais implantados em defeitos ósseos mostraram que a formação de tecido mineralizado em presença de um biomaterial depende da topografia e da porosidade da superfície do biomaterial implantado [10]. Entretanto, pouco se conhece ainda sobre a influência da morfologia da superfície e da dimensão dos poros dos implantes nos processos de mineralização e formação óssea nas escalas micrométrica e sub-micrométrica ($< 100 \mu\text{m}$). As limitações para avançar nesse conhecimento são impostas pela complexidade de acompanhar experimentalmente os processos de interação das células com as superfícies em estudos *in vivo*.

Neste contexto, investigar os processos de mineralização através de experimentos *in vitro*, realizados em substratos com topografias complexas e controladas que mimetizam superfícies com microporosidades, têm sido um caminho para se obter informações

importantes sobre os processos *in vivo*. O desenvolvimento de topografias e dispositivos microfluídicos através de técnicas de microfabricação têm sido uma ferramenta importante no desenvolvimento de modelos *in vitro* que visam responder questões fundamentais relacionadas à interação entre as células e as superfícies complexas de biomateriais [11, 12].

2 Cultura celular em estruturas microfabricadas

Experimentos de cultura celular, *in vitro*, realizados em substratos com topografias controladas têm sido um caminho usado para mimetizar processos de interação entre células e materiais *in vivo* [13]. Elas possibilitam a aquisição de dados mais acurados sobre o comportamento e metabolismo de células normais e de origem tumoral, em ambientes com topografias controladas [14]. Para esses estudos, as técnicas de microfabricação têm sido uma ferramenta essencial.

Diferentes técnicas de micro e nanofabricação são empregadas no desenvolvimento de modelos biomiméticos para estudos *in vitro* do comportamento celular. Jung e colaboradores [15] fabricaram um dispositivo microfluídico para cultura de organoides cultivados a partir de células primárias cancerígenas coletadas de um paciente. O intuito desse trabalho foi criar um dispositivo que permitisse estudo *in vitro* de medicamentos eficazes no tratamento do câncer de forma personalizada, ou seja, avaliar qual a terapia mais eficaz para cada paciente. O dispositivo microfluídico foi fabricado através da técnica de *soft-lithography* usual, onde silicone líquido é colocado em um molde, fabricado através de fotolitografia, e após cura é desmoldado e utilizado para cultura dos organoides.

Erlach *et al.* [16] mostraram como diferentes topografias influenciam a diferenciação de células tronco mesenquimais humanas (hMSCs). Células tronco cultivadas em estruturas triangulares e quadradas tendem a se diferenciar em células do tipo osteoblastos, enquanto células cultivadas em padrões circulares tendem a se diferenciar em células adiposas, mostrando que a topografia do meio pode ser usada como um parâmetro de controle da diferenciação celular. As estruturas em silicone usadas no experimento foram fabricadas através de técnicas de *soft-lithography* usual onde réplicas das estruturas são obtidas a partir de um molde fabricado através de fotolitografia.

Herzer *et al.* [17] avaliaram a adesão, migração e diferenciação de células tronco mesenquimais humanas (hMSCs) cultivadas em microtubos compostos por uma liga de titânio e nióbio. Os microtubos foram fabricados a partir de técnicas usuais de microfabricação, como de fotolitografia, deposição de metais via *sputtering* e *lift-off*, permitindo fabricar tubos com diâmetro comparáveis ao tamanho de uma célula. Esse tipo de estrutura permitiu o estudo de comportamento celular em ambientes confinados, e mostrou que células são capazes de mineralizar em ambientes com dimensões entre 10–30 μm .

Hasturk *et al.* [18] mostraram que microestruturas compostas por pilares fabricados em polimetilmetacrilato (PMMA) promovem maior atividade osteogênica quando

comparadas aos substratos lisos fabricados com o mesmo material, mostrando que a modificação da topografia pode ser uma alternativa a métodos de indução química na promoção da atividade osteogênica. Isso porque microtopografias compostas por pilares induzem mudanças no formato do citoesqueleto e do núcleo, que geram sinais que promovem a expressão de marcadores osteogênicos. Neste trabalho, um gabarito para os moldes foi fabricado através da técnica de fotolitografia, a partir desse gabarito foram fabricados moldes em silicone. Esses moldes foram utilizados na fabricação das microestruturas em PMMA usadas no experimento.

Pieuchot *et al.* [19] utilizaram estruturas em silicone compostas por padrões sinusoidais a fim de estudar a migração celular. Eles descreveram um mecanismo denominado curvotaxi que permite às células responderem a variação da curvatura do meio através da interação dinâmica entre núcleo e citoesqueleto, onde o núcleo age como sensor mecânico que guia as células para regiões côncavas. As estruturas em silicone foram fabricadas a partir de um molde fabricado através do processo de *through-mask electrochemical micromachining*. Esse processo permite a fabricação de padrões micrométricos, a partir da corrosão eletroquímica de regiões selecionadas do substrato metálico, e possibilita a fabricação de microestruturas com curvatura controlada.

Moerk *et al.* [20] utilizaram microestruturas compostas por pilares de silício a fim de estudar o mecanismo de transdução entre a topografia do meio extracelular e o processo de sinalização intracelular que induz expressão osteogênica de células ósseas. As microestruturas foram fabricadas a partir da técnica de *deep reactive-ion etching* (DRIE), onde uma atmosfera de íons foi utilizada para corroer ao longo de uma direção às regiões expostas do substrato de silício. Os resultados deste trabalho mostraram que a proteína ROCK está envolvida no processo de sinalização intracelular oriundo do estímulo da topografia do meio extracelular.

Os exemplos apresentados, demonstram a importância do uso de técnicas de microfabricação para aplicações em biologia celular. Este projeto de mestrado tem como proposta desenvolver um protocolo detalhado de fabricação de microestruturas acessível a pesquisadores que se interessam pela pesquisa sobre comportamento de células em topografias controladas. As técnicas utilizadas neste trabalho podem ser estendidas para fabricação de outros dispositivos baseados na técnicas de *soft-lithography*.

3 Motivação e objetivos

Nos últimos anos, diversos trabalhos em modelos animais têm sido publicados na literatura internacional sobre o papel de micro e nanoporos na regeneração óssea [21–23]. Uma das questões mais discutida é o mecanismo de mineralização *in vivo* em situações onde os poros possuem dimensões inferiores aos das células. São propostos modelos de mineralização não controlada e controlada a distância pelas células, respectivamente [24]. Até o momento não existe respostas a estas questões devido a dificuldade de se obter informações experimentais sobre os complexos processos de mineralização que ocorrem *in vivo*. Por isto, estudos *in vitro* que mimetizam interações de células ósseas com superfície microporosas podem oferecer informações adicionais que contribuem para o esclarecimento dos complexos mecanismos de mineralização em presença de biomateriais.

A motivação deste trabalho é desenvolver competência técnica em microfabricação de topografias para estudos de comportamento de células em substratos complexos. Em especial, objetiva-se fabricar microtopografias com diferentes geometrias, com escala na ordem do tamanho celular, cerca de 20 μm , através de técnicas de fotolitografia e de *soft-lithography*, que simulem a microporosidade geralmente utilizada em arcabouços de biomateriais fabricados para a regeneração óssea.

As topografias serão fabricadas em substratos inertes do polímero dimetilpolisiloxano (PDMS) para eliminar efeitos da química da superfície no comportamento celular. Após a fabricação, os substratos serão testados em cultura de células ósseas para avaliação do efeito da topografia na viabilidade celular em comparação com substratos lisos.

4 Fabricação e caracterização das microestruturas: Métodos e resultados obtidos

As etapas de fabricação das microestruturas em PDMS para cultura celular possuem similaridades com as etapas de fabricação de dispositivos microeletrônicos. As técnicas de fotolitografia são utilizadas na fabricação de dispositivos aplicados nas duas áreas, mas com finalidades diferentes. O uso de fotolitografia permite a fabricação de padrões com geometrias diversas. Já o uso de *soft-lithography* [25] permite a fabricação de estruturas em polímeros biocompatíveis, de baixo custo, e em grande escala. Essas técnicas foram escolhidas para este trabalho, pois agilizam o processo de fabricação de substratos 3D para cultura celular, além de garantir reprodutibilidade das mesmas.

A produção das topografias consiste na fabricação de um molde a partir do qual são fabricadas as estruturas em substrato polimérico. O molde pode ser reutilizado várias vezes, permitindo a fabricação de centenas de estruturas em tempo reduzido e com baixo custo.

4.1 Fotolitografia

Neste trabalho usamos a técnica de fotolitografia para a fabricação dos moldes a partir dos quais serão fabricadas as estruturas em silicone. O processo de fabricação dos moldes envolve a fabricação de fotomáscaras, onde os padrões são transferidos via fotolitografia por inscrição direta, e a fabricação dos moldes a partir da transferência dos padrões das fotomáscaras, via fotolitografia por contato.

A fotomáscara consiste em um substrato com regiões opacas e transparentes a transmissão de luz. Substratos transparentes, como vidro e quartzo, são empregados na fabricação das fotomáscaras. As regiões opacas são geralmente formadas por material metálico depositado sobre o substrato transparente. A variação entre regiões opacas e transparente permite a formação dos padrões de exposição, que dão origem aos padrões litográficos. A Fig. 4.1 ilustra o princípio de funcionamento da fotomáscara.

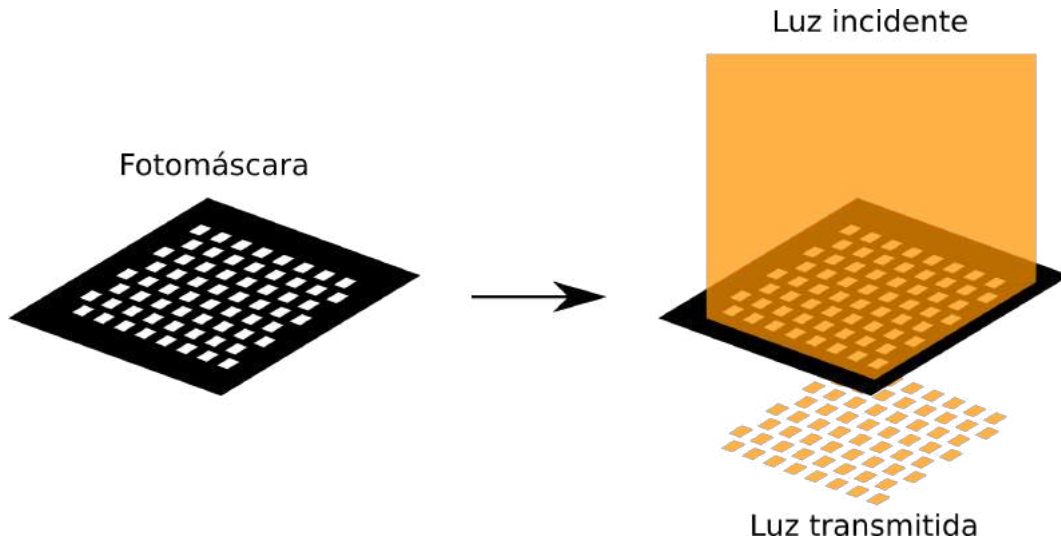


Figura 4.1: Ilustração do princípio de funcionamento da fotomáscara. As regiões opacas bloqueiam a transmissão de luz, e as regiões transparentes permitem a transmissão de luz.

O processo de fotolitografia por inscrição direta é feito pelo equipamento *laser-writer*. Esse equipamento utiliza um feixe de laser para fazer a inscrição dos padrões litográficos em um polímero fotossensível (fotorresiste). Os padrões a serem inscritos são desenhados em um software CAD (e.g. LibreCAD, KLayout, AutoCAD, etc.). Em seguida, é feito o upload desse desenho no equipamento *laser-writer*. Ao ser acionado, o equipamento faz a inscrição dos padrões do desenho no fotorresiste. A Fig.4.2 ilustra o processo de fotolitografia por inscrição direta.

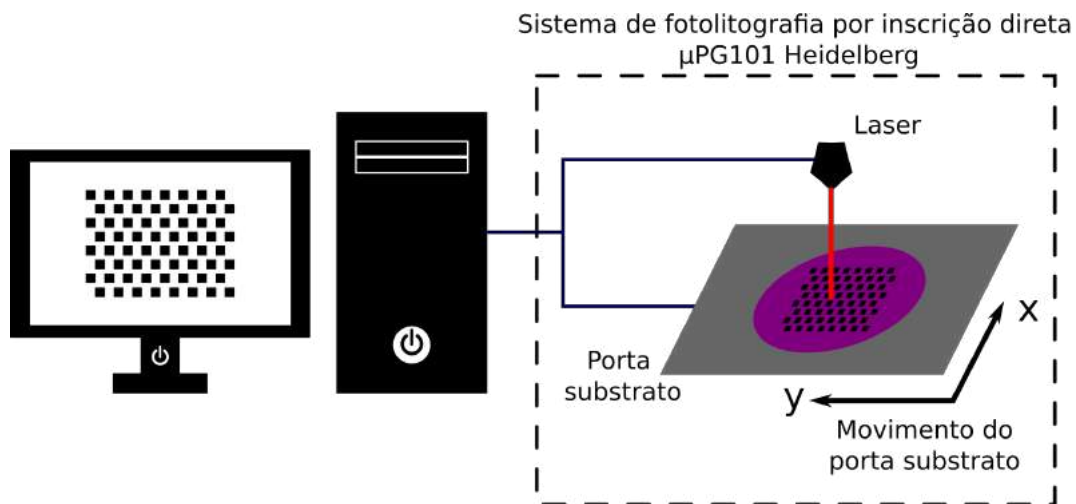


Figura 4.2: Ilustração do processo de fotolitografia por inscrição direta.

No processo de fotolitografia por contato, utiliza-se a fotoalinhadora na transferência dos padrões da fotomáscara para o fotorresiste. Nesse processo, uma fotomáscara é colocada em contato com o fotorresiste. Em seguida a luz emitida pela fotoalinhadora incide sobre a fotomáscara, de forma que as regiões transparentes da fotomáscara permitam a transmissão da luz. A luz incide no fotorresiste, induzindo assim a fotoreação do polímero e dando origem aos padrões litográficos. A Fig.4.3 ilustra o processo de fotolitografia por contato.

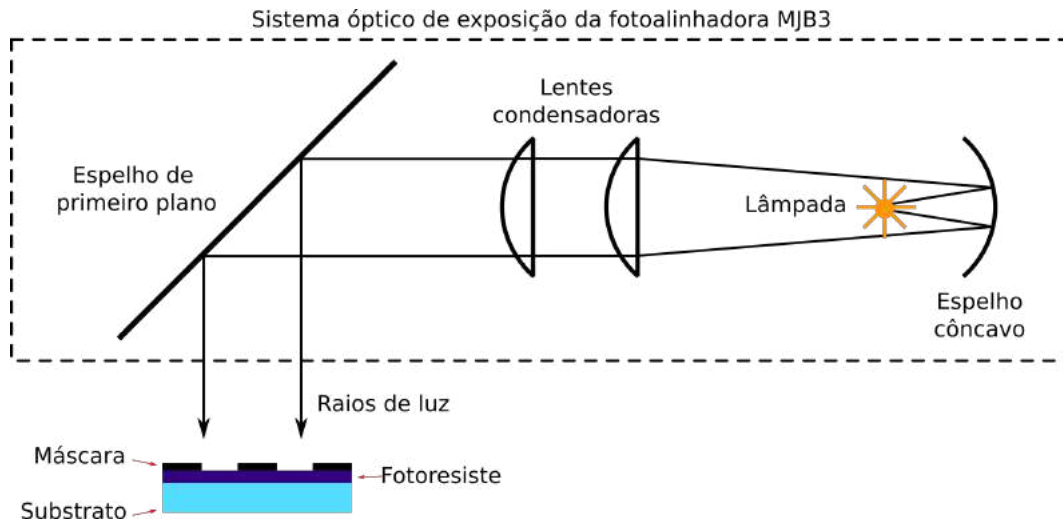


Figura 4.3: Ilustração do processo de fotolitografia por contato.

As etapas básicas do processo de fotolitografia são: i) recobrimento do substrato com fotorresiste; ii) exposição do fotorresiste para sensibilizar as regiões de interesse com a radiação UV; iii) e revelação das estruturas, onde remove-se quimicamente as regiões sensibilizadas.

Na etapa de recobrimento, usa-se o processo de *spin-coat* para cobrir a superfície do substrato com fotorresiste [26]. Nessa etapa, o fotorresiste é colocado sobre o substrato e o conjunto é rotacionado a fim de espalhar o polímero uniformemente sobre a superfície. A Fig.4.4 ilustra o processo de *spin-coat*.

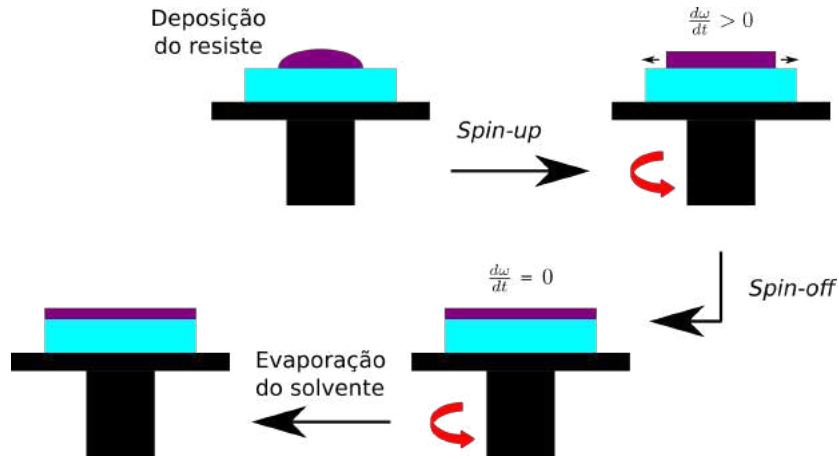


Figura 4.4: Ilustração do processo de *spin-coating*

De forma simplificada, é possível controlar a espessura final (h_f) do fotorresiste pois a mesma varia com o inverso da velocidade angular do substrato Eq.(4.1).

$$h_f \propto \frac{1}{\sqrt{\omega}} \quad (4.1)$$

Após depositado sobre a superfície, o fotorresiste é exposto à radiação UV. Os fotorresistes utilizados são compostos por uma mistura de resina novolac, solvente e composto fotoativo, diazonaftoquinona (DNQ). A resina novolac é solúvel nas soluções alcalinas, tais como o hidróxido de sódio (NaOH), hidróxido de potássio (KOH), ou hidróxido de tetrametilamônio (TMAH), enquanto o DNQ é insolúvel nessas soluções. Dessa forma, a mistura de novolac com DNQ corrói a uma taxa muito lenta nas soluções mencionadas. Quando exposto à radiação UV, o DNQ libera nitrogênio e se liga quimicamente as moléculas de água presente no polímero, e no final dessa reação o DNQ é convertido em ácido indeno carboxílico que é solúvel nas soluções básicas mencionadas [27]. A Fig.4.5 mostra o processo de fotoreação descrito.

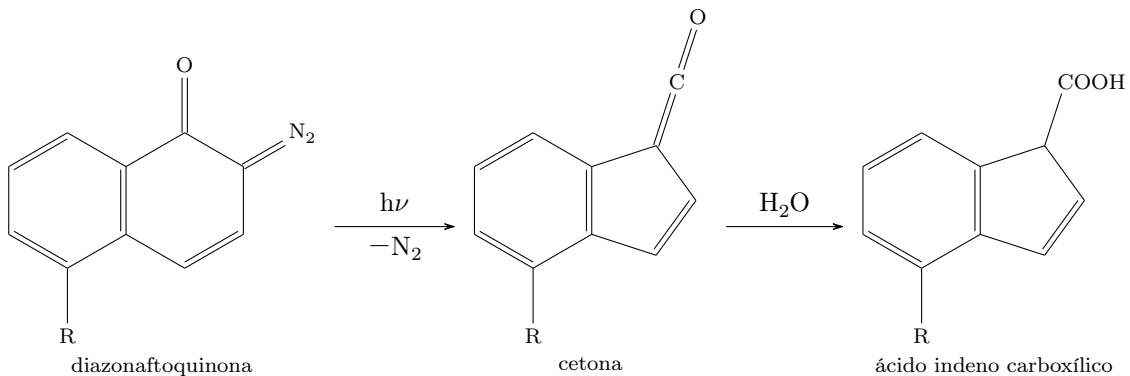


Figura 4.5: Fotoreação do DNQ. Ilustração da reação química que converte DNQ no ácido indeno carboxílico.

Após exposição ao UV, o novolac e o DNQ se solubilizam em soluções básicas. Isso permite que durante a etapa de revelação as regiões do fotorresiste expostas à radiação UV se solubilizem, enquanto as regiões não expostas permaneçam praticamente insolúveis. Esse processo de transformação do DNQ, de um elemento insolúvel em revelador para um solúvel, é a base de funcionamento do processo fotoquímico dos fotorresistes.

4.2 Fabricação da fotomáscara

A fotomáscara fabricada consiste em um filme de alumínio depositado sobre substrato de vidro, com regiões opacas (alumínio) e transparentes (vidro) à transmissão de radiação UV Fig.4.6.

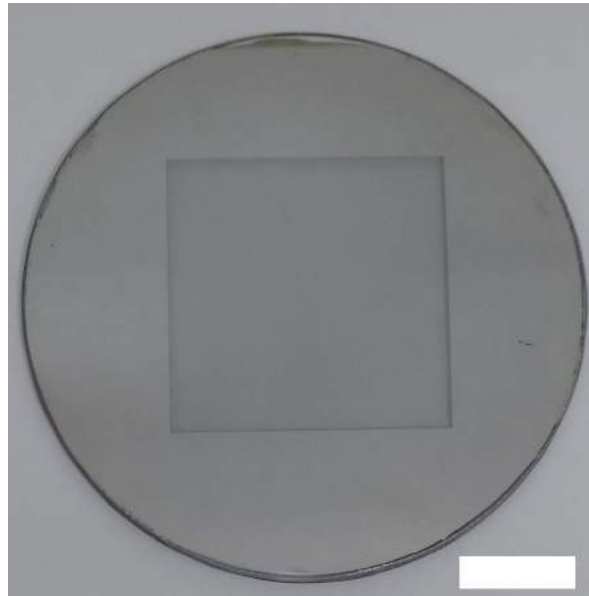


Figura 4.6: Imagem da fotomáscara fabricada a partir de um filme de alumínio depositado sobre substrato de vidro, com regiões opacas (alumínio) e transparentes (vidro). Escala: 2cm.

A primeira etapa de fabricação da fotomáscara consiste em depositar um filme de alumínio sobre o substrato de vidro. O filme deve ter espessura suficiente para bloquear radiação ultravioleta. Neste trabalho depositou-se filmes de alumínio com aproximadamente 100 nm de espessura pela técnica de *sputtering*. Vale ressaltar que outros materiais podem ser depositados (e.g. cromo, óxido de ferro, entre outros) assim como o uso de outras técnicas de deposição. De forma simplificada, a técnica de *sputtering* consiste em bombardear a superfície de um alvo com ions formados em uma atmosfera de plasma. A colisão dos ions com a superfícies do alvo ejeta átomos que são depositados sobre um substrato. A Fig.4.7 ilustra o processo de deposição via *sputtering*.

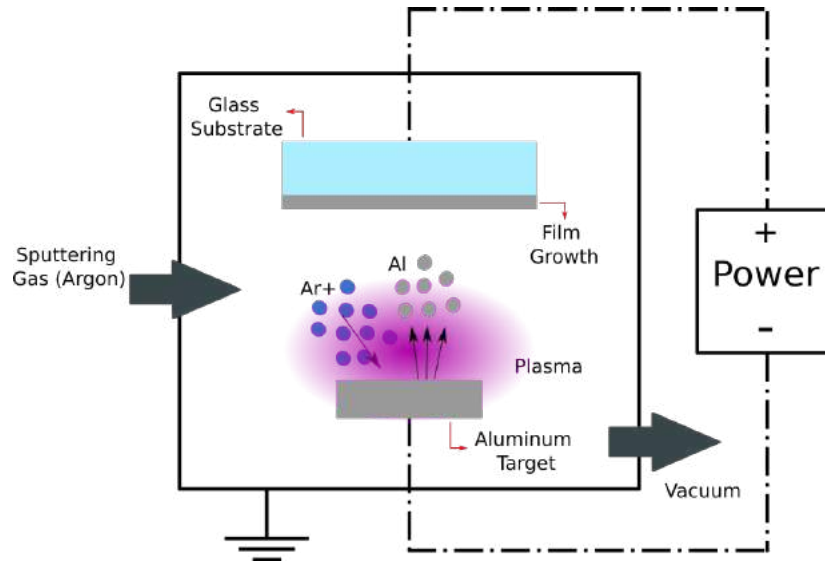


Figura 4.7: Ilustração do processo de deposição via *sputtering*. O alvo de alumínio é bombardeado com íons de argônio, e o alumínio pulverizado é depositado sobre o substrato de vidro.

4.2.1 Inscrição dos padrões na fotomáscara

A segunda etapa de fabricação da fotomáscara é a de inscrição dos padrões na fotomáscara. Para isso, cobre-se o filme de alumínio com uma camada de fotorresiste (AR-P 3510, Allresist), a uma velocidade angular de 4000 rpm, por 70 s, formando uma camada de fotorresiste com cerca de $2 \mu\text{m}$ de espessura. Em seguida, faz-se a etapa de *soft-baking*, onde coloca-se o substrato sobre a placa aquecedora, a $100 \text{ }^\circ\text{C}$, por 1 minuto a fim de promover maior adesão do fotorresiste ao substrato e remover o excesso de solvente. Após a remoção do substrato da placa aquecedora, e o mesmo atingir temperatura ambiente, inicia-se a etapa inscrição dos padrões da fotomáscara através de fotolitografia por inscrição direta, usando a *laser-writer* (20 mW, 50%; μPG 101, Heidelberg Instruments) cujo comprimento de onda do laser é 409 nm. A Fig.4.8 mostra três exemplos de padrões topográficos que foram inscritos nas fotomáscaras, os padrões inscritos são desenhados em um software CAD (LibreCAD).

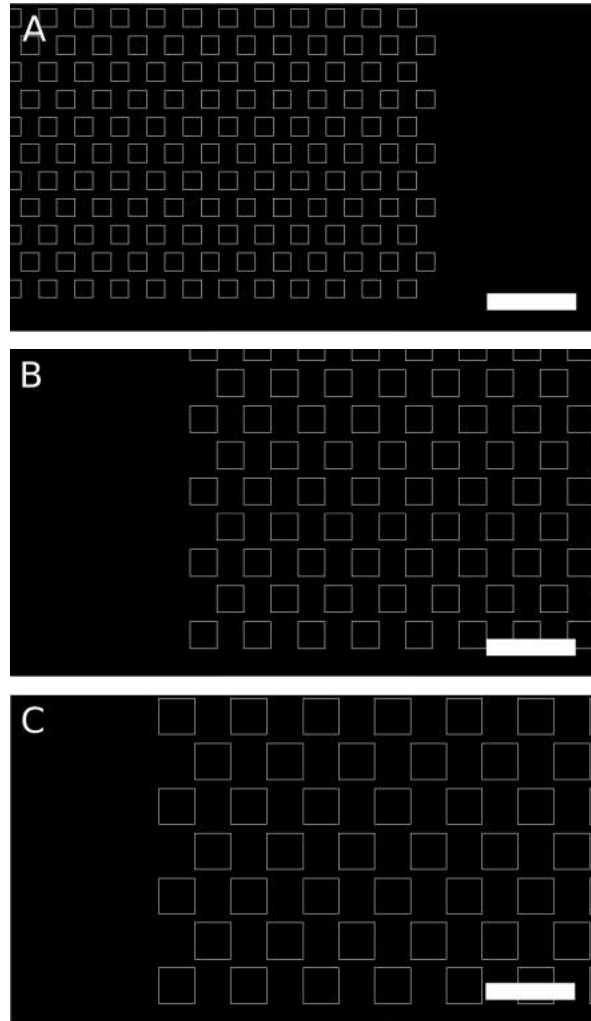


Figura 4.8: Desenho em CAD dos padrões inscritos na fotomáscara. Os quadrados nas figuras (A), (B) e (C) apresentam, respectivamente, $10 \times 10 \mu\text{m}$, $15 \times 15 \mu\text{m}$ e $20 \times 20 \mu\text{m}$. Escala: $50 \mu\text{m}$.

Após a inscrição dos padrões da fotomáscara, segue-se para a etapa de revelação das estruturas. Coloca-se o substrato em uma solução composta pelo revelador (AR 300-47, Allresist)¹ diluído em água deionizada na proporção de 1:1, deixa-se agir por 1 minuto, em seguida lava-se as estruturas reveladas com água deionizada para neutralizar a ação do revelador. A Fig.4.9 mostra as estruturas após o processo de revelação.

¹O revelador AR 300-47 não é indicado para fabricação de fotomáscaras em alumínio pois a solução básica corrói o material. Para evitar transtornos, certifique-se de que os insumos utilizados são compatíveis.

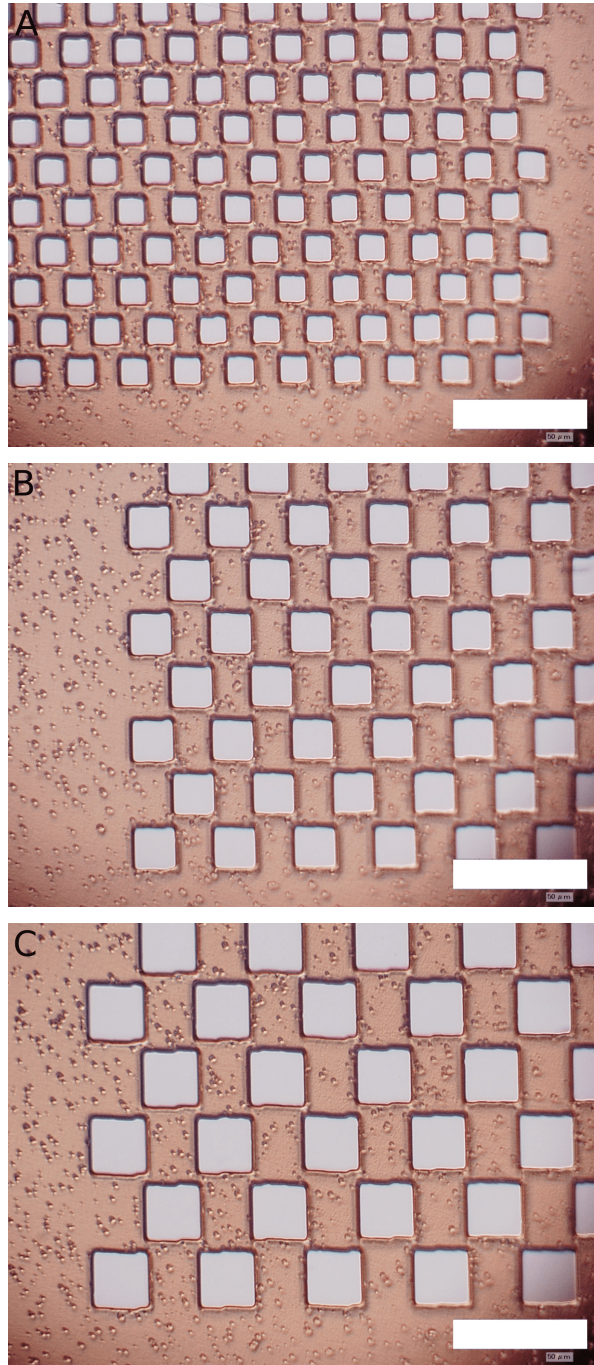


Figura 4.9: Padrões distintos da fotomáscara após revelação. Nota-se a presença de microbolhas de água na superfície. Escalas: 50 μm .

A Fig.4.10 ilustra o processo de inscrição e revelação dos padrões da fotomáscara.

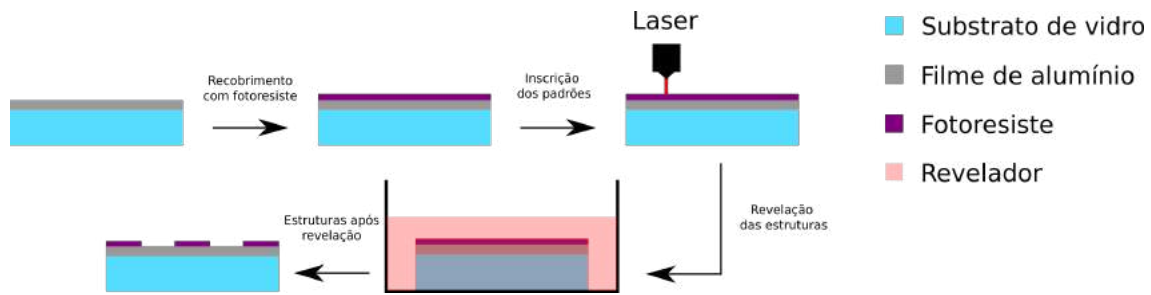


Figura 4.10: Ilustração do processo de inscrição e revelação dos padrões da fotomáscara.

Após o processo de revelação, a região exposta no interior dos quadrados corresponde ao alumínio que será corroído através do processo de corrosão química por via úmida. Esta técnica consiste em remover material da superfície de um substrato com uma dada solução química. Nessa etapa, processos de *underetching* podem ocorrer quando há perda de adesão do fotorresiste ao substrato. Nessa situação, a solução corroedora infiltra por baixo do fotorresiste corroendo o alumínio não exposto após a etapa de revelação, danificando os padrões da máscara. A Fig.4.11 ilustra como o processo de *underetching* danifica os padrões, as setas vermelhas indicam as regiões que sofreram *underetching*.

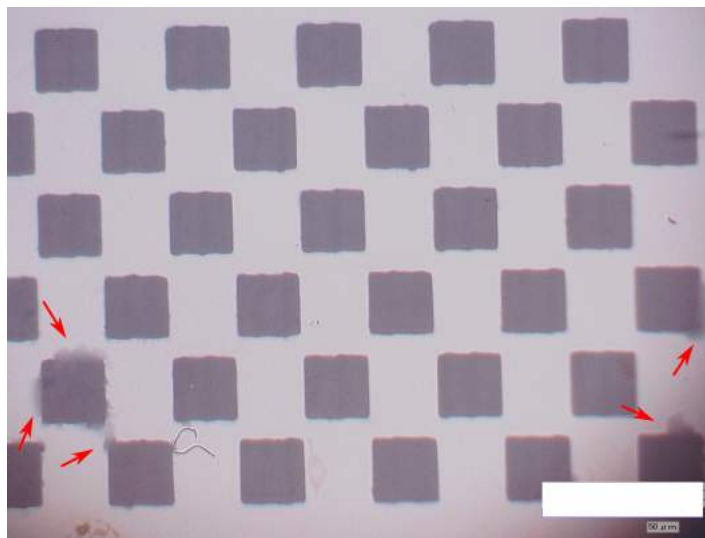


Figura 4.11: A figura ilustra como o processo de *underetching* deforma as estruturas da máscara, as setas vermelhas indicam as regiões que sofreram *underetching*. Escala: 50 µm.

A fim de evitar o *underetching* é recomendado fazer um *hard-baking* após a etapa da revelação para promover maior adesão do resiste ao substrato [28]. No processo de fabricação usado neste trabalho, efetua-se o *hard-baking* colocando-se o substrato na

placa aquecedora, a 100 °C, durante 70 s. A Fig.4.12 ilustra as estruturas após esse processo. O processo de *hard-baking* também elimina as bolhas de água presente na superfície após a etapa de revelação, vide Fig.4.9.

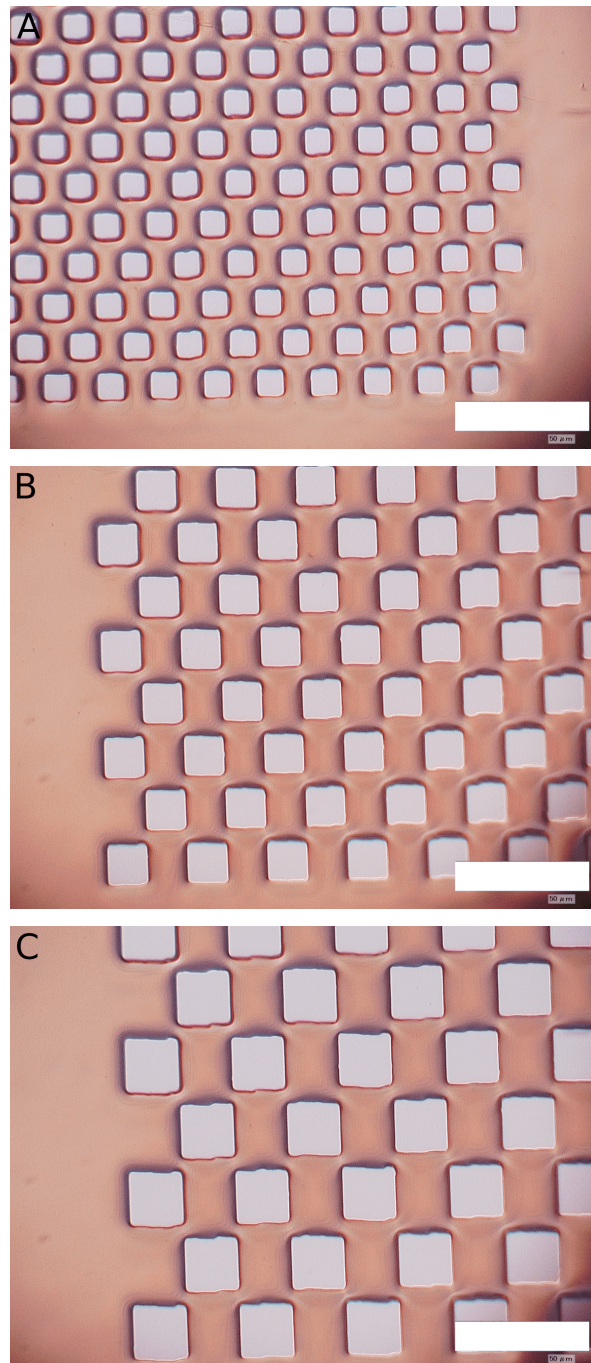


Figura 4.12: Padrões da fotomáscara após *hard-baking*. Nota-se a eliminação das bolhas de água da superfície. Escala: 50 µm.

4.2.2 Etapa de corrosão do alumínio

O alumínio foi corroído através do processo de corrosão química por via úmida, onde uma solução ácida foi preparada a fim de corroer o alumínio exposto na Fig.4.12. Os compostos químicos utilizados nesta etapa são:

- H_3PO_4 - Ácido fosfórico (85 wt%);
- CH_3COOH - Ácido acético (100 wt%);
- HNO_3 - Ácido nítrico (65 wt%);
- Água deionizada.

Os compostos químicos foram misturados na seguinte proporção: 70% H_3PO_4 , 5% de CH_3COOH , 5% de HNO_3 , e 20% de água deionizada [29]. A mistura dos reagentes promove um aumento da temperatura da solução. Portanto, ela é utilizada somente após o seu resfriamento. A corrosão do filme de alumínio, 100 nm de espessura, é realizada cobrindo-se o substrato com a solução a uma temperatura de 35 °C, por cerca de 40 s. A Fig.4.13 ilustra o processo de corrosão do alumínio da fotomáscara.

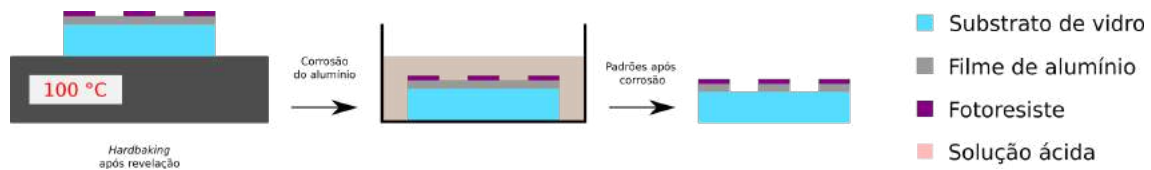


Figura 4.13: Ilustração do processo de corrosão do alumínio da fotomáscara

Após corrosão, lava-se a fotomáscara com água destilada para remover o excesso da solução ácida. Em seguida, a fotomáscara é colocada em um recipiente com água destilada por 5 minutos e posteriormente seca com ar comprimido. A Fig.4.14 ilustra três padrões distintos da fotomáscara após a etapa de corrosão.

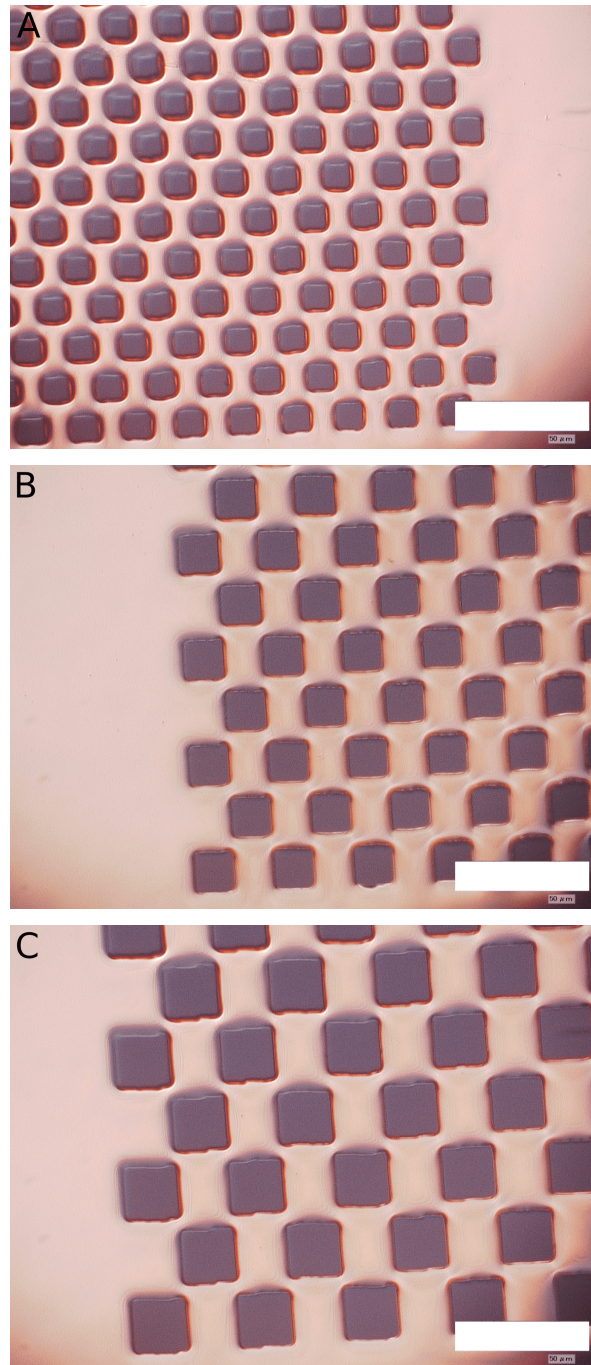


Figura 4.14: Padrões da fotomáscara após a corrosão do alumínio em temperatura de 35 °C por 40 s. Escala: 50 µm.

Após a etapa de corrosão, o resiste remanescente é removido com banho de acetona, seguido de isopropanol. As Fig.4.15 e Fig.4.16 ilustram os padrões da fotomáscara após remoção do resiste remanescente e padrões inscritos para seis fotomáscaras com geometrias distintas. As regiões escuras correspondem ao vidro exposto após corrosão do alumínio, essas regiões são transparentes a passagem de luz, e as regiões claras

correspondem ao alumínio não corroído, responsável por bloquear a transmissão da luz através do vidro.

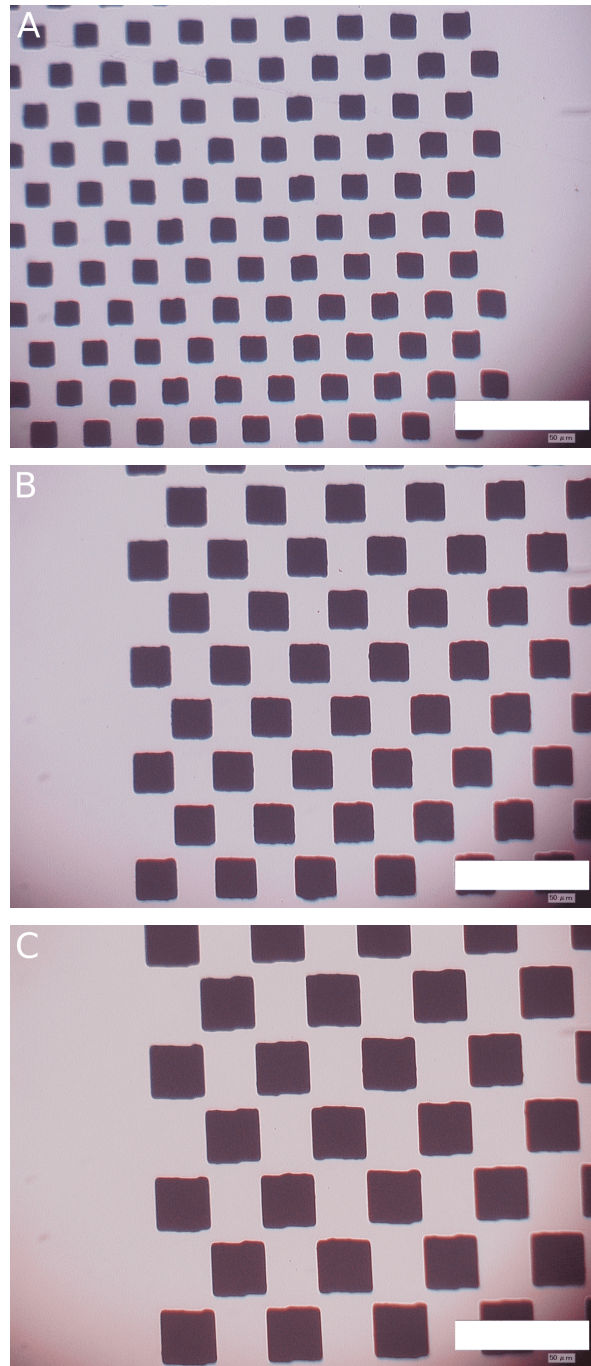


Figura 4.15: Padrões da fotomáscara após remoção do resiste. A região escura corresponde ao vidro exposto após a etapa de corrosão, e a região clara ao alumínio não corroído. Escala: 50 μm .

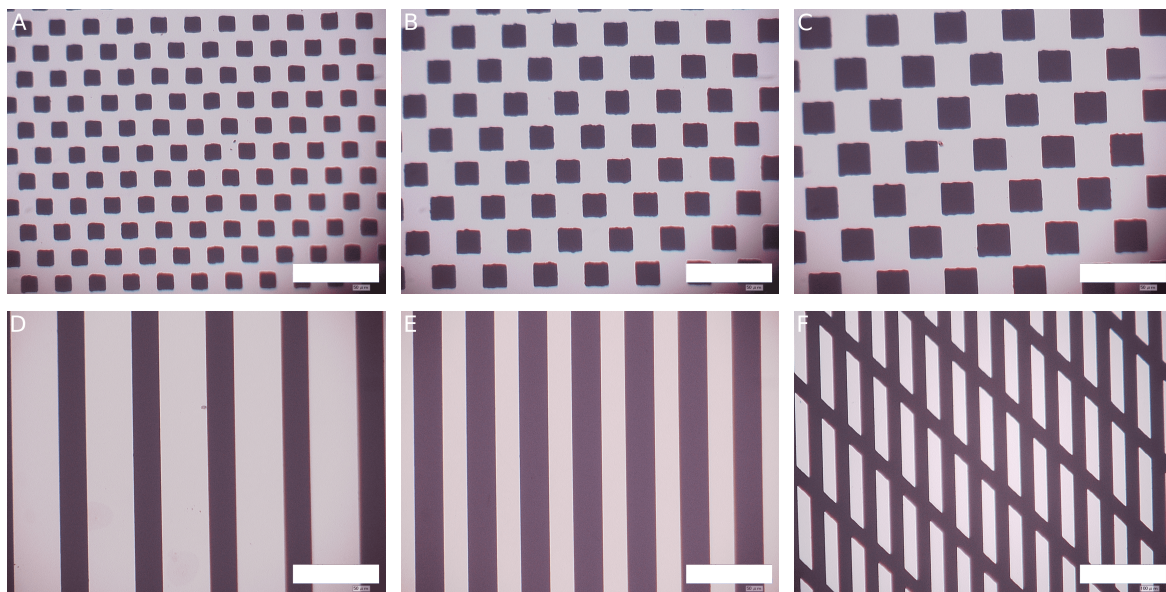


Figura 4.16: Padrões geométricos de diferentes fotomáscaras produzidas neste trabalho. A região escura corresponde ao vidro exposto após a etapa de corrosão, e a região clara ao alumínio não corroído. Escalas: figuras (A) até (E) 50 μm , figura (F) 100 μm .

Sumário das etapas de fabricação das fotomáscaras:

- Deposição de filme de alumínio via *sputtering* (Sputtering Confocal MS) sobre a superfície do vidro;
- *Spin-coat* do fotorresiste (AR-P 3510, Allresist) a 4000 rpm, por 1 min sobre o filme de alumínio depositado;
- *Soft-bake* a 100 °C por 70 s em um prato quente (EMS 1000-1, Electronic Micro Systems Ltd), essa etapa visa promover maior adesão do fotorresiste ao substrato e eliminar o excesso de solvente após a etapa de *spin-coating*;
- Inscrição dos padrões através do sistema de fotolitografia (20 mW, 50%; μPG 101, Heidelberg Instruments);
- Revelação das estruturas em solução de água deionizada: revelador (AR 300-47, Allresist) na proporção de 1:1 por 42 s;
- *Hard-bake* a 100 °C por 70 s;
- Corrosão do alumínio exposto através do processo de corrosão por via úmida;
- Lavagem da fotomáscara com água destilada a fim de remover a solução corrodora;

- Remoção do resiste remanescente da fotomáscara com acetona e álcool isopropílico;

4.3 Fabricação dos moldes

Os moldes foram fabricados através do processo de fotolitografia por contato. A Fig.4.17 ilustra um dos moldes fabricados.

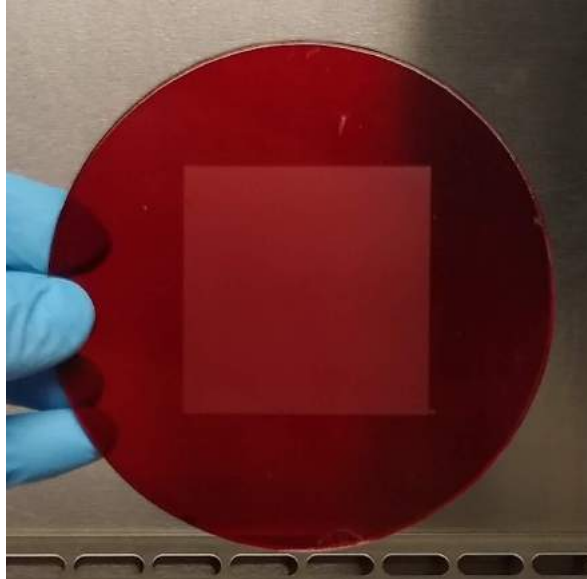


Figura 4.17: Imagem de um dos moldes fabricados. A região mais clara indica a área com as microestruturas.

No processo de fotolitografia por contato, a fotoalinhadora (MJB3, Karl Suss) foi utilizada na transferência dos padrões das fotomáscaras para um polímero fotossensível. Nesse processo, a fotomáscara produzida é colocada em contato com um substrato coberto com fotorresiste. Ao acionar a fotoalinhadora, a luz emitida por uma lâmpada de mercúrio incide sobre a fotomáscara, de forma que a luz atravessa somente as regiões transparentes da fotomáscara e incide sobre o fotorresiste. A luz incidente no fotorresiste induz o processo de fotoreação, e as regiões sensibilizadas são removidas no processo de revelação, dando origem as estruturas do molde. A Fig.4.18 ilustra o processo de fabricação dos moldes.

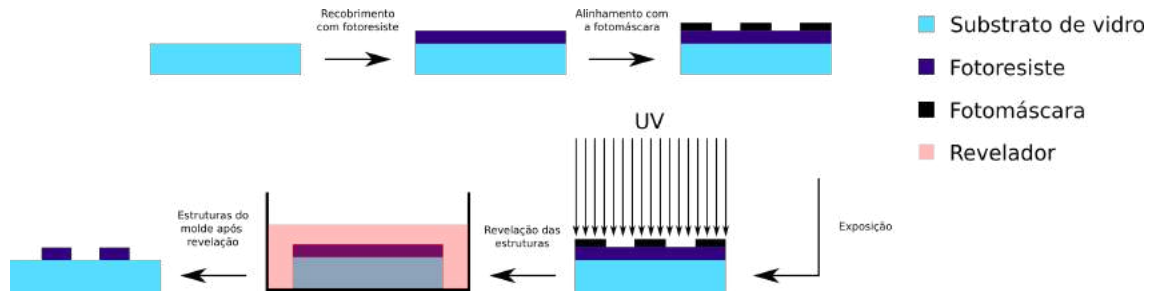


Figura 4.18: Ilustração do processo de fabricação dos moldes.

A fotoalinhadora foi escolhida para esta etapa pois torna o processo de fabricação dos moldes mais rápido. Para o desenho das estruturas dos moldes, a duração do processo na *laser-writer* é de 1.5 h enquanto a duração da exposição na fotoalinhadora é de 24 s. A fotoalinhadora também ofereceu melhor resolução para estruturas. A *laser-writer* oferece melhor resolução que a fotoalinhadora para resistes com $\sim 1 \mu\text{m}$ de espessura, mas a espessura do fotorresiste usado na fabricação dos moldes é de $\sim 12 \mu\text{m}$. Após os testes de dosagem com a *laser-writer*, verificou-se que a potência e tempo de exposição necessários para sensibilizar ao longo dessa espessura tornava a resolução das estruturas expostas inferior a exposição com a fotoalinhadora.

A fotoalinhadora ofereceu boa resolução para as estruturas expostas, mas notou-se que a dimensão das estruturas após a revelação foram levemente maiores do que os padrões da fotomáscara. Essa diferença entre os tamanhos é intrínseco do processo de fotolitografia por contato, pois as bordas dos desenhos são sensibilizadas para além dos limites impostos pelos padrões da fotomáscara. Uma forma de compensar esses defeitos seria fazer desenhos das fotomáscaras com dimensões entre $1 \mu\text{m}$ e $2 \mu\text{m}$ menores do que o desenho original.

A Fig.4.19 mostra os padrões dos moldes fabricados. As três imagens do topo (Fig.4.19 A, B e C) são compostas por poços de base quadrada com dimensões de $10 \mu\text{m}$, $15 \mu\text{m}$ e $20 \mu\text{m}$, e as três imagens da base (Fig.4.19 D, E e F) são compostas por ranhuras com aproximadamente $15 \mu\text{m}$ de largura e diferentes espaçamentos. Os padrões desses moldes correspondem ao negativo dos padrões das estruturas finais em PDMS.

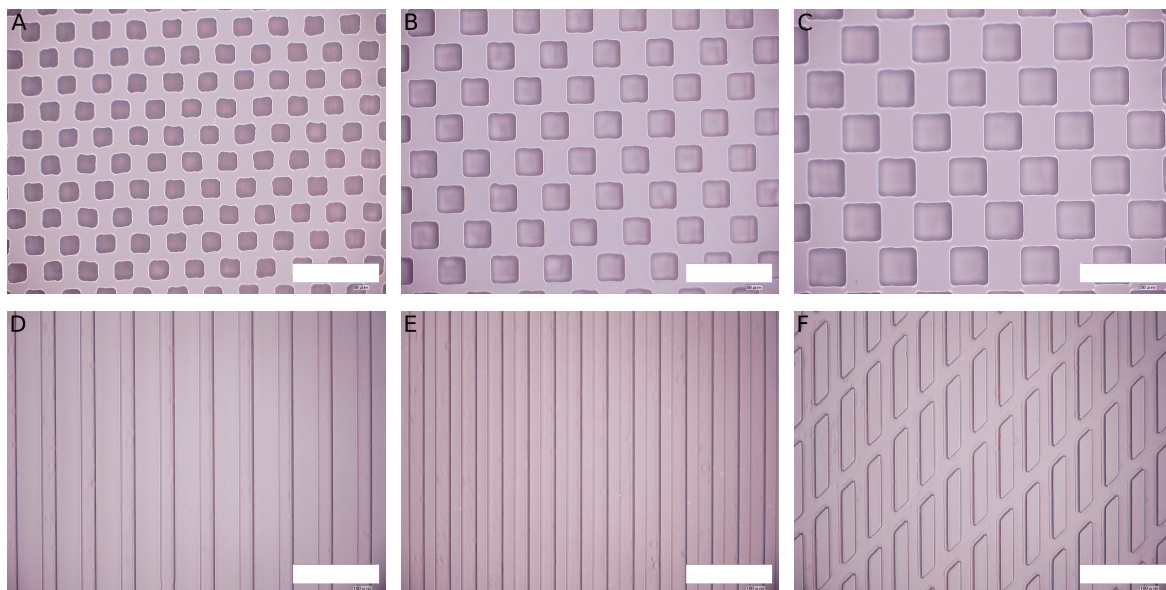


Figura 4.19: Padrões geométricos dos moldes fabricados, as três imagens do topo são compostas por poços de base quadrada com dimensões de 10 μm , 15 μm e 20 μm , e as três imagens da base são compostas por ranhuras com aproximadamente 15 μm de largura e diferentes espaçamentos. Escalas: figuras (A) até (C) 50 μm , figuras (D) até (F) 100 μm .

Sumário das etapas de fabricação dos moldes:

- *Spin-coat* do fotorresiste (AR-P 3210, Allresist), a 2000 rpm, por 2 min, sobre substrato de vidro;
- *Soft-bake* em temperatura de 70 °C por 5 min, seguido de *soft-bake* a 95 °C por 10 min;
- Esfriamento e reidratação do substrato por tempo superior a 1.5 h;
- Uso da fotoalinhadora (MJB3, Karl Suss) para transferir os padrões da fotomáscara para o molde (24 s de exposição);
- Revelação das estruturas em solução de água deionizada: revelador (AR 300-26, Allresist) na proporção de 1:3 por 3 min;
- *Hard-bake* na temperatura de 95 °C por 2 min.

Durante a etapa de *soft-bake*, o resiste desidrata devido a evaporação das moléculas de água. Portanto, antes da exposição é necessário deixar o substrato esfriar a temperatura ambiente a fim de reidratar o fotorresiste. Como é indicado na Fig.4.5, é necessária a presença de moléculas de água para que o fotorresiste seja sensibilizado pela luz. O tempo de reidratação varia com a espessura do resiste. Para resiste com

espessura de $\sim 1 \mu\text{m}$ a reidratação ocorre em alguns segundos, enquanto resiste com $\sim 100 \mu\text{m}$ levam várias horas para reidratar. O tempo de reidratação para os moldes fabricados neste projeto foi cerca de 1.5 h. Após revelação, a etapa final de *hard-bake* visa remover a umidade remanescente na superfície após revelação, e promover maior adesão do resiste ao substrato.

4.3.1 Funcionalização da superfície moldes

Os moldes são funcionalizados com grupos silanol a fim permitir o descolamento do silicone da sua superfície. Nesse processo, moléculas de hexametildisilazano (HMDS) reagem com as hidroxilas presentes na superfície do molde formando grupos silanol. O HMDS é tóxico e o processo de silanização gera vapor de amônia. Por isso, esta etapa deve ser executada em uma capela de exaustão. A Fig.4.20 ilustra o processo de silanização.

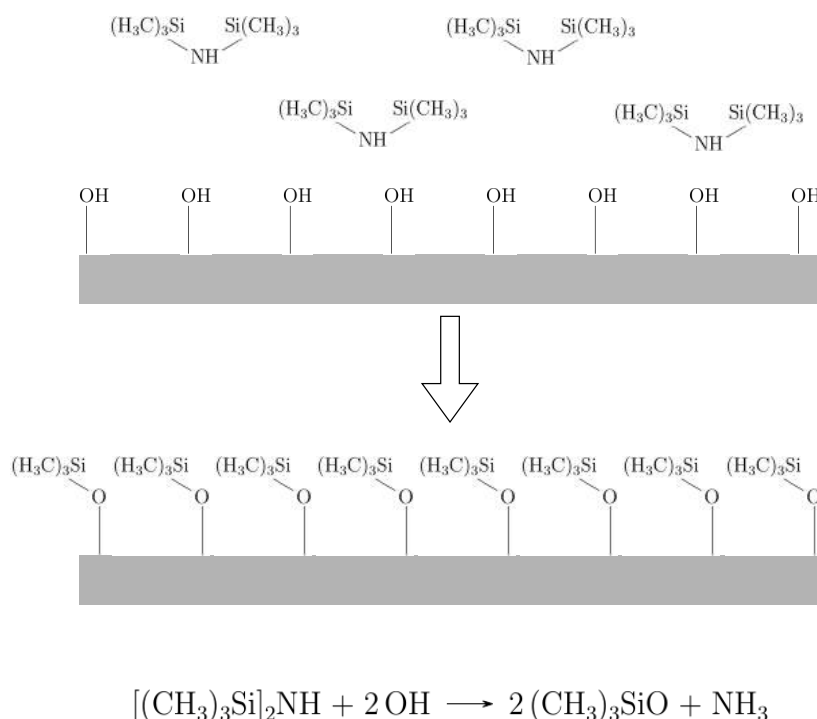


Figura 4.20: Ilustração do processo de silanização. Reação química das moléculas de silano com os grupos hidroxila presentes na superfície do molde.

Para as estruturas fabricadas, foi necessário tratar a superfície dos moldes com plasma antes do processo de silanização. Sem essa etapa, o silicone adere nas estruturas do molde, impedindo sua remoção por completo durante a etapa de desmolde. O tratamento com plasma introduz mais grupos hidroxila na superfície, promovendo

maior silanização das estruturas e evitando que o silicone permaneça aderido nas estruturas durante o processo de desmolde [30]. Neste projeto, tanto plasma com ar atmosférico (PELCO easiGlow) quanto plasma de oxigênio (PlasmaPro 80) foram eficazes no processo de hidrofilição das superfícies. No geral, qualquer tratamento com plasma em baixa potência (< 100 W) funciona no processo de hidrofilição, cabe ao usuário avaliar a eficiência do processo de acordo com suas necessidades.

Sumário das etapas do processo de silanização:

- Tratamento da superfície dos moldes com plasma de oxigênio (50 sccm, 100 mTorr, 50 W; PlasmaPro 80, Oxford Instruments) por 1 min. Esta etapa visa limpar e introduzir mais grupos hidroxila na superfície dos moldes;
- Tratamento dos moldes com uma gota (~ 0.5 ml) de HMDS em um dessecador, em vácuo primário, por 5 min. Após o tratamento, desligar a bomba de vácuo, vedar o dessecador, e deixar os molde no vapor de silano por 2 h;
- Retirada dos moldes do dessecador e armazenar em local seco.

4.4 *Soft-Lithography*

Soft-Lithography [31] engloba um conjunto de técnicas utilizadas na fabricação de micro e nano estruturas a partir de um polímero elastomérico. Geralmente, utilizam-se moldes ou carimbos para fabricar ou replicar as estruturas [32]. Neste trabalho, utilizamos fotolitografia na fabricação dos moldes e a partir deles fabricamos as microestruturas em PDMS. Essa técnica apresenta a vantagem de possuir baixo custo, comparada com outras técnicas de micro e nano fabricação, visto que os moldes podem ser reutilizados para fabricar estruturas em PDMS sem a necessidade de equipamentos caros.

4.4.1 **Fabricação das estruturas em PDMS**

Após a funcionalização da superfície, os moldes podem ser usados para a fabricação das estruturas em PDMS. Nesta última etapa são fabricadas as microestruturas que serão utilizadas nos experimentos de cultura celular. Para a fabricação das microestruturas, mistura-se o silicone (Sylgard 184, Dow Corning) com o agente de cura na proporção de 10:1. Remove-se bolhas de ar dissolvidas na mistura através de repetidos ciclos de pressurização e evacuação, em um recipiente com vácuo. A seguir, preenche-se o molde com o silicone e trata-se em estufa a uma temperatura de 60 °C por 6 h. Finalmente, descola-se o silicone do molde em temperatura ambiente e acondiciona-se

o silicone em um recipiente fechado, em local seco. A Fig.4.21 ilustra o processo de fabricação das microestruturas em silicone.

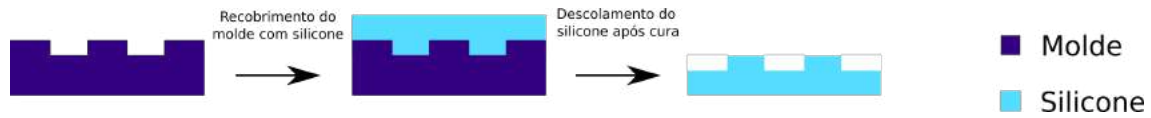


Figura 4.21: Ilustração do processo de fabricação das microestruturas em silicone.

Sumário das etapas de fabricação das microestruturas em silicone:

- Mistura do silicone (Sylgard 184, Dow Corning) com o agente de cura na proporção de 10:1;
- Remoção de bolhas dissolvidas na mistura através de repetidos ciclos de pressurização e evacuação, em um recipiente propício para vácuo;
- Preenchimento do molde com o silicone e tratamento em estufa a uma temperatura de 60 °C por 6 h;
- Descolamento do silicone do molde em temperatura ambiente e acondicionamento do silicone em um recipiente fechado, em local seco.

A Fig.4.22 ilustra as microestruturas em silicone fabricadas para os experimentos de cultura celular. As microestruturas apresentadas na Fig.4.22A simulam superfícies microporosas que foram usadas no estudo do comportamento de células ósseas. As microestruturas apresentadas na Fig.4.22B e Fig.4.22C simulam fibras longitudinais e entrelaçadas, e foram usadas no estudo do comportamento de cultura de células cancerígenas (não descritos nesse trabalho).

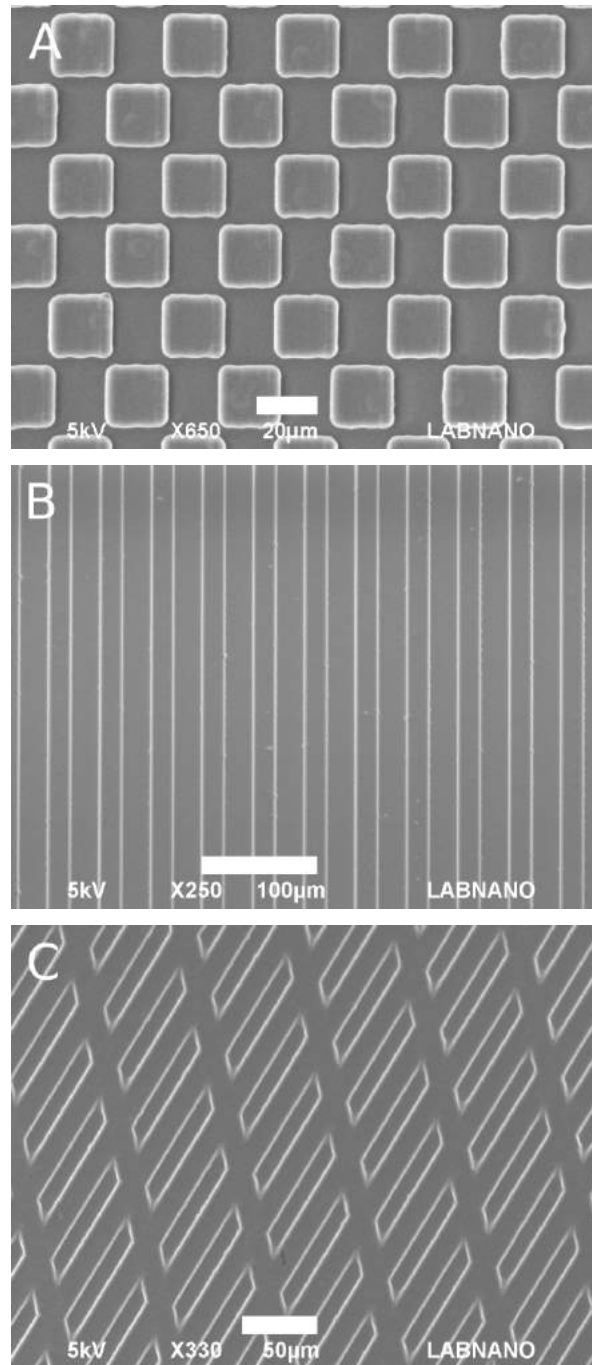


Figura 4.22: Imagens de microscopia eletrônica de varredura de microestruturas em PDMS, com diferentes topografias, produzidas a partir dos moldes. Escalas: (A) 20 μm , (B) 100 μm e (C) 50 μm .

4.4.2 Deformação do silicone na presença de HMDS líquido

O HMDS na forma líquida costuma ser empregado na secagem de amostras biológicas para microscopia eletrônica de varredura. A secagem via HMDS apresenta a

vantagem de ser rápida e barata, comparada a métodos como ponto crítico, porém HMDS na forma líquida é incompatível com o PDMS. Durante o processo de secagem, nota-se uma dilatação acentuada das amostras cobertas com HMDS mais etanol Fig.4.23, tornando inviável a utilização desse método de secagem para células cultivadas em amostras de PDMS. Portanto, a secagem das amostras através do método de ponto crítico é uma alternativa à secagem por HMDS para esse tipo de amostra. Esse método usa CO₂ líquido para remover umidade das amostras biológicas a serem processada para MEV.

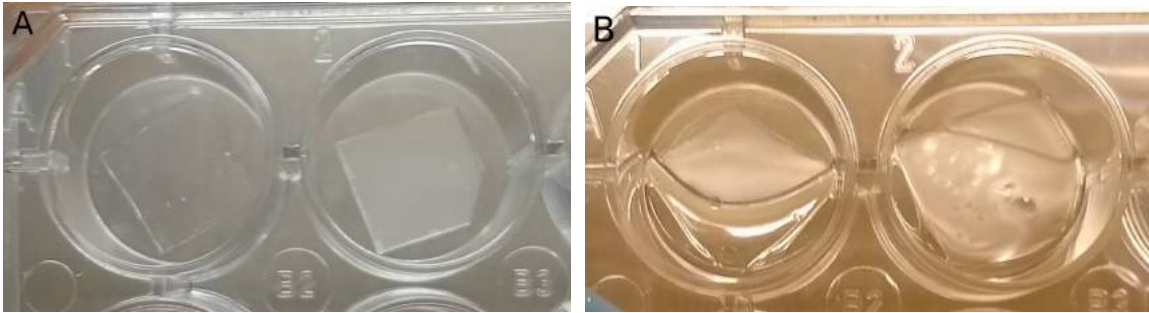


Figura 4.23: Deformação do PDMS na presença de HMDS líquido. Antes (A) e depois (B) do PDMS entrar em contato com HMDS líquido.

O HMDS é um solvente não polar e essa categoria de solvente deforma o silicone. Durante testes realizados em laboratório (não descritos neste projeto), nota-se que a dilatação do silicone diminui com a concentração do HMDS, e o PDMS aparenta não dilatar na presença de vapor desse composto.

A amostra em PDMS volta ao seu tamanho original conforme o HMDS evapora. E as estruturas não deformam permanentemente, a Fig.4.24 compara uma amostra tratada com HMDS, Fig.4.24A1 e Fig.4.24A2, e uma amostra não tratada, Fig.4.24B1 e Fig.4.24B2, nota-se que após evaporação completa não há diferença entre as estruturas tratadas e não tratadas com HMDS.

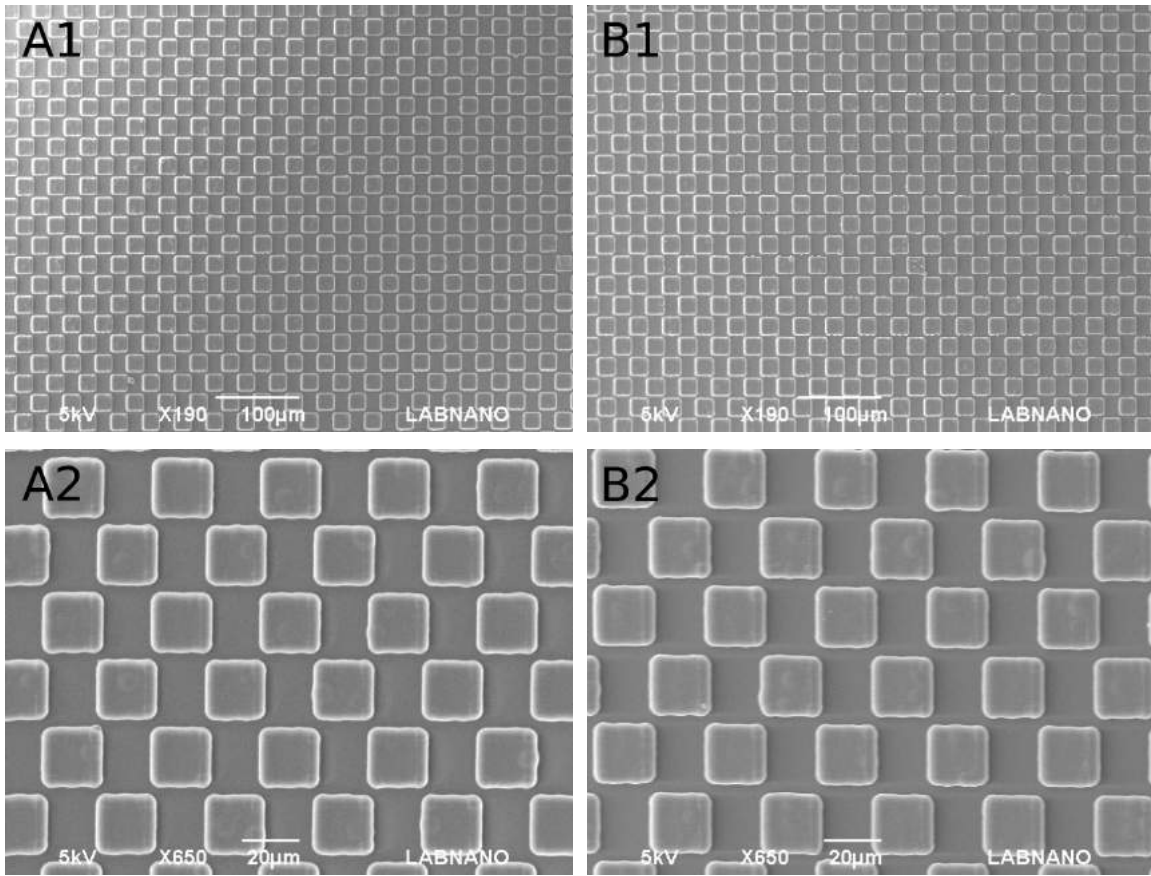


Figura 4.24: Comparação entre estruturas tratadas (coluna **A**) e não tratadas (coluna **B**) com HMDS líquido. Nota-se que a deformação das estruturas não é permanente.

5 Cultura celular em topografia formada por micropilares

Ensaio de viabilidade e mineralização de células F-OST (osteoblastos do fêmur de murino) [33] foram executados em superfície lisa e sob estrutura microfabricada de PDMS, constituída por pilares de base quadrada com aproximadamente 20 μm de lado e 12 μm de altura, Fig.4.22A. Esta estrutura mimetiza uma superfície microporosa de enxertos sintéticos usados para a substituição ou regeneração óssea como foi discutida na seção 3.

As análises morfológicas foram feitas através de análises de microscopia de fluorescência e microscopia eletrônica de varredura (MEV). O processo de secagem com HMDS das amostras para MEV mostrou-se incompatível com as amostras produzidas em PDMS. Portanto, os resultados de cultura celular sobre as topografias são apresentados majoritariamente a partir de análises morfológicas obtidas por microscopia de fluorescência. A Fig.5.1 mostra as células após 24 h de cultura nos substratos compostos por pilares em PDMS.

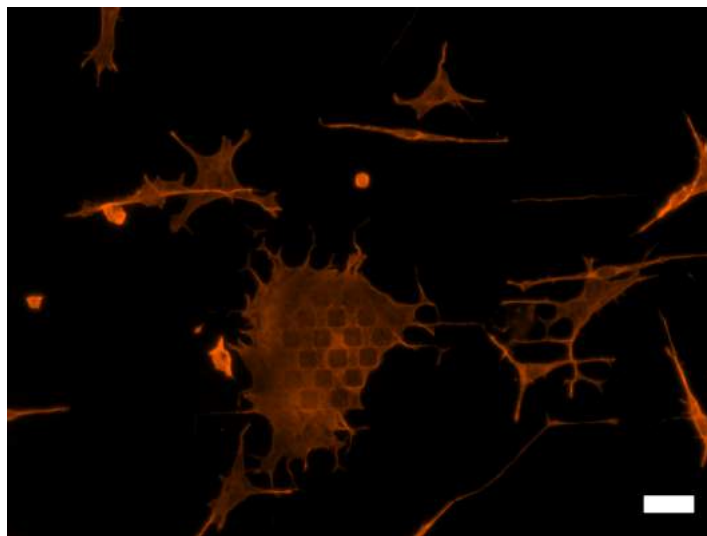


Figura 5.1: Células F-OST cultivadas sobre pilares em PDMS por 24 h. Escala: 50 μm .

5.1 Materiais e métodos

5.1.1 Cultura celular

Para os ensaios de viabilidade celular e marcação de actina, 25×10^3 células foram plaqueadas sobre os substratos e cultivadas em meio DMEM High Glucose (Gibco) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco) e incubadas a 37 $^{\circ}\text{C}$ em atmosfera

úmida contendo 5% de CO₂ por 24 h.

Antes de iniciar o experimento de cultura celular, as amostras foram esterilizadas a fim de evitar contaminação por microrganismos. Métodos usuais de esterilização como UV e álcool 70% na presença de UV não foram efetivos para as amostras em PDMS. A baixa eficácia da esterilização pode estar relacionada a porosidade da superfície, superfícies porosas previnem uma distribuição uniforme da radiação UV, impedindo uma esterilização efetiva [34]. Por conta disso, as amostras foram esterilizadas por radiação gama (15 kGy), que atravessa as amostras de PDMS e é efetiva em desativar microrganismos como fungos, bactérias, vírus, e esporos.

5.1.2 Ensaio PrestoBlue

O ensaio de viabilidade foi avaliado usando o kit PrestoBlue (Invitrogen). Esse kit usa o poder de redução das células vivas para medir de forma quantitativa a viabilidade celular. Quando adicionado ao meio, o reagente é absorvido pelas células, sofre redução e se transforma num composto vermelho fluorescente, que pode ser detectado através de medidas de fluorescência ou absorção. O ensaio PrestoBlue foi realizado adicionando o reagente a uma concentração de 10% ao meio de cultura celular e incubando por 30 min, a 37 °C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Após incubação, a placa com as células foi analisada pelo leitor de placas (Synergy II, Biotek).

5.1.3 Ensaio Live/Dead

A viabilidade celular também foi avaliada através do ensaio Live/Dead (Invitrogen) Fig.5.4. Após cultura celular, o meio de cultura foi removido, e as células foram lavadas com PBS estéril (pH 7.4), incubadas simultaneamente com o reagente Live/Dead, EthD-1 [3 µM] e Cal-AM [6 µM], por 30 min em câmara úmida e ao abrigo de luz. Após incubação, as células foram observadas por microscopia de epifluorescência (Axio Observer A1, Zeiss). A coloração verde fluorescente, Calceína-AM (Cal-AM), indicando as células vivas e a coloração vermelho fluorescente, homodímero-1 de etídio (EthD-1), indicando as células mortas.

5.1.4 Marcação de actina

Após cultura celular, o meio de cultura foi removido e as células foram lavadas com solução de PBS estéril (pH 7.4). Em seguida, as amostras foram fixadas em 4% de paraformaldeído (PFA). Após fixação, as células foram lavadas com PBS estéril (pH 8), e foi adicionado NH₄Cl (20 mM) por 10 min. Após incubação, as células foram lavadas

com PBS estéril (pH 8), e permeabilizadas com uma solução de 0.1% de Triton X-100 + 1% de BSA (albumina de soro bovino), diluído em PBS estéril (pH 8), por 10 min. Após permeabilização, as células foram novamente lavadas com PBS estéril (pH 8) e incubadas com o anticorpo Alexa-Fluor 546 conjugado com faloidina, na proporção de 1:80, durante 30 min em atmosfera úmida. Após incubação, as células foram observadas por microscopia de epifluorescência (Axio Observer A1, Zeiss).

5.1.5 Processamento de imagens e análises estatísticas

A morfologia das células cultivadas em substrato lisos e com topografia composta por pilares foi avaliada a partir das imagens de marcação de actina obtidas por microscopia de fluorescência. Para cada substrato, selecionou-se 5 campos das imagens de microscopia de fluorescência e a partir dessas imagens analisou-se a área celular, o número de células, a área de ocupação celular e a circularidade usando os softwares gratuitos e de código aberto Fiji e JASP. O número de células presentes no conjunto de imagens para o substrato liso variou entre 7 e 17 células, e para o substrato com pilar variou entre 14 e 23 células. As análises de variância foram feitas através do teste One-Way ANOVA, onde o nível de significância adotado foi de 0.05.

Medidas de circularidade foram feitas a fim de analisar as diferenças no formato das células cultivadas nos substratos lisos e nos substratos compostos por pilares. Circularidade com valor 1 indica um círculo perfeito, e circularidade tendendo a zero indica formato alongado ou dendrítico.

$$\text{Circularidade} = \frac{4\pi \cdot \text{Área}}{\text{Perímetro}^2} \quad (5.1)$$

A medida de circularidade foi feita excluindo as células que estavam parcialmente contidas dentro do campo da imagem. Para isso, a segmentação das células Fig.5.2A foi editada de forma que as células contidas parcialmente (indicadas pelas setas vermelhas) dentro da área da figura fossem removidas, a Fig.5.2B mostra a imagem após edição.

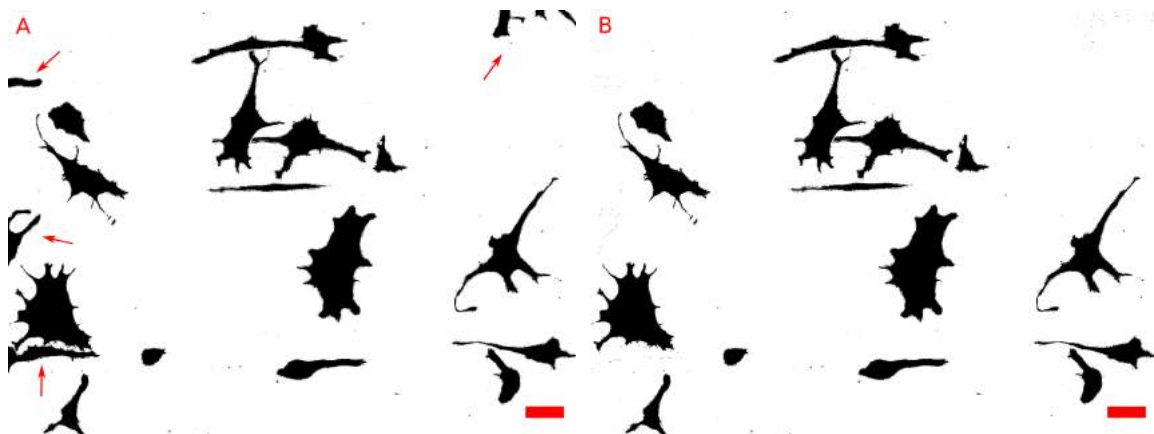


Figura 5.2: Edição das imagens para medida de circularidade. (A) Segmentação da imagem original, as setas vermelhas indicam segmentação de células parcialmente inseridas no campo da imagem. (B) Segmentação editada para medida de circularidade, células contidas parcialmente no campo da imagem foram removidas. Escala: 50 μm .

5.1.6 Experimento de mineralização celular

A partir dos testes de viabilidade, observamos que as estruturas em PDMS são viáveis para experimentos de cultura celular, porém possuem uma adesão celular limitada. As células desgrudavam da superfície do substrato durante o processamento das amostras para análises. Para promover maior adesão das células aos substratos, as superfícies foram recobertas com fibronectina (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) prévio ao plaqueamento das células.

A fibronectina é uma proteína adesiva que compõe a matriz extra celular, ela adere a superfície em PDMS por absorção ou por ligações covalentes. Essa proteína forma sítios de ancoragem para as células, permitindo maior adesão das mesmas às estruturas em PDMS [35].

Para o experimento de mineralização, foram plaqueadas 50×10^3 células sobre as superfícies previamente cobertas com fibronectina. Três dias após o plaqueio das células, foi adicionado meio osteogênico composto por DMEM High Glucose suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% de penicilina/estreptomicina, beta-glicerofosfato (10 $\mu\text{l}/\text{ml}$) e ácido ascórbico (0,05 mg/ml), a troca do meio se deu a cada três dias.

Sumário do experimento de mineralização:

- Diluir a fibronectina em PBS estéril de forma a obter concentração de 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$
- Lavar as superfícies em PDMS com PBS estéril, essa etapa visa quebrar a hidrofobicidade da superfície para facilitar o recobrimento com a fibronectina
- Cobrir as superfícies com fibronectina por 30 min

- Remover o excesso de fibronectina e deixar a superfície secar
- Plaquear as células, e incubar por 3 h, a 37 °C em atmosfera úmida com 5% de CO₂
- Passadas 3 h, adicionar meio de cultura e incubar as células, a 37 °C em atmosfera úmida com 5% de CO₂
- Após 3 dias, fazer a troca do meio, adicionar meio osteogênico
- Efetuar a troca do meio osteogênico a cada 3 dias, até o final do experimento de mineralização

5.1.7 Processamento das amostras para MEV

Após o experimento de cultura celular, as amostras para microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram fixadas em fixador Karnovsky (Glutaraldeído 2.5%, formaldeído 2.5% em tampão cacodilato de sódio 0.05M, pH 7.2). Após fixação, as amostras foram lavadas em solução tampão cacodilato de sódio 0.1 M (CaCo 0.1 M) por quatro vezes, 10 minutos cada lavagem. Posteriormente, as amostras foram incubadas por 20 min em tetróxido de ósmio 2% e CaCo 0.1 M, na proporção de 1:1. Após fixação em ósmio, lava-se as amostras quatro vezes com CaCo 0.1 M, 10 min cada lavagem. Em seguida, as amostras foram desidratadas através da imersão em série graduada de etanol (10%, 35%, 50%, 70%, 80%, 90%, 100%), 10 min cada série. A fim de evitar dilatação do substratos em PDMS, as amostras foram secas através do método do ponto crítico ao invés da secagem com HMDS. Após secagem, as amostras foram metalizadas com ouro por 2 min.

5.2 Resultados

5.2.1 Viabilidade celular

A viabilidade celular foi avaliada para as superfícies com pilares e superfícies lisas de PDMS. A Fig.5.3 mostra a intensidade de fluorescência após 24 de cultura, essa medida está diretamente relacionada a quantidade de células vivas presentes nos substratos. A partir do teste de viabilidade, observa-se que há uma quantidade maior de células presentes nos substratos com microestruturas compostas por pilares quando comparado a superfície lisas.

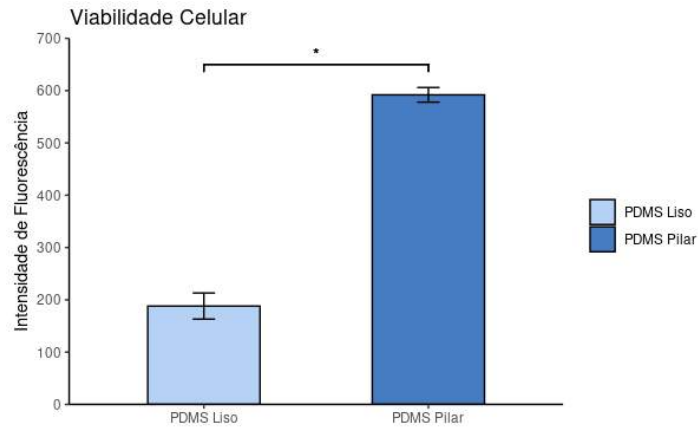


Figura 5.3: Teste de viabilidade celular em substratos lisos e com pilares em PDMS (* $p < 0.001$, $n = 2$).

O ensaio de viabilidade Live/Dead foi feito a fim de avaliar se a diferença no número de células presentes nos substratos se deu devido à morte celular, ou se foi influenciada das topografias na adesão celular. A comparação entre a quantidade de células vivas e mortas para cada substrato foi feita através da separação dos canais RGB da imagem original, onde o canal verde marca as células vivas e o vermelho marca as células mortas. Após separação dos canais, as células foram segmentadas através do ajuste de *threshold*, onde a intensidade do pixel é usado como delimitador, de forma que a área ocupada por células vivas (Fig.5.4A2 e Fig.5.4B2) e mortas (Fig.5.4A3 e Fig.5.4B3) é dada pela região preta na Fig.5.4. O processamento das imagens foi feito através do software Fiji.

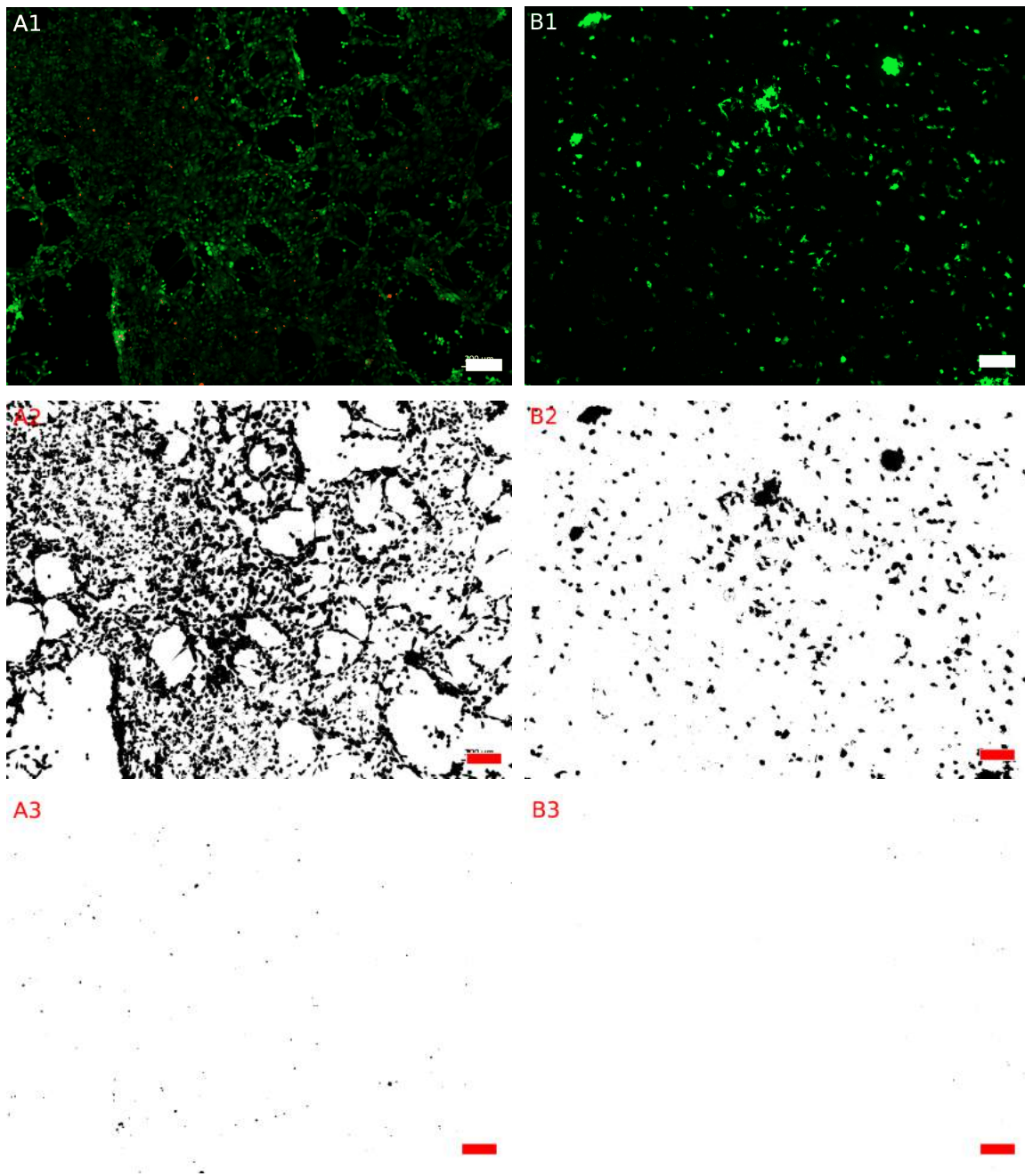


Figura 5.4: Ensaio live/dead , 24 h de cultura celular. Coluna (A) células cultivadas sobre pilares em PDMS, coluna (B) células cultivadas sobre PDMS liso. (A1) e (B1) Ensaio live/dead, células marcadas em verde estão vivas e as em vermelho estão mortas. (A2) e (B2) Segmentação de células vivas. (A3) e (B3) Segmentação de células mortas. Escalas: 200 μm .

A partir dos dados do ensaio de viabilidade Fig.5.3 e da área de ocupação das células vivas e morta em Fig.5.4, observa-se que a diferença entre o número de células presentes nos substratos não se dá devido a morte celular. Uma hipótese para a diferença observada é que a topografia simulando uma superfície porosa possui área superficial maior e isso promove maior adesão das células quando comparada a superfície lisa

[36, 37]. Quanto maior for a adesão das células ao substrato, mais elas tendem a se proliferar.

A partir das análises apresentadas, mostra-se que as topografias produzidas são apropriadas para experimentos de cultura celular, e observa-se que mesmo para superfícies hidrofóbicas, como o PDMS, a modificação da topografia é suficiente para promover o aumento da adesão celular, o que pode ser uma alternativa a métodos químicos de indução de adesão.

5.2.2 Avaliação da morfologia celular

A morfologia celular nas superfícies compostas por pilares em PDMS e nas superfícies lisas em PDMS, Fig.5.5, foi avaliada por microscopia de fluorescência através da marcação de actina com o fluoróforo Faloidina Alexa Fluor 546 (Invitrogen). As medidas morfológicas e análises estatísticas foram feitas através dos softwares gratuitos e de código aberto Fiji e JASP.

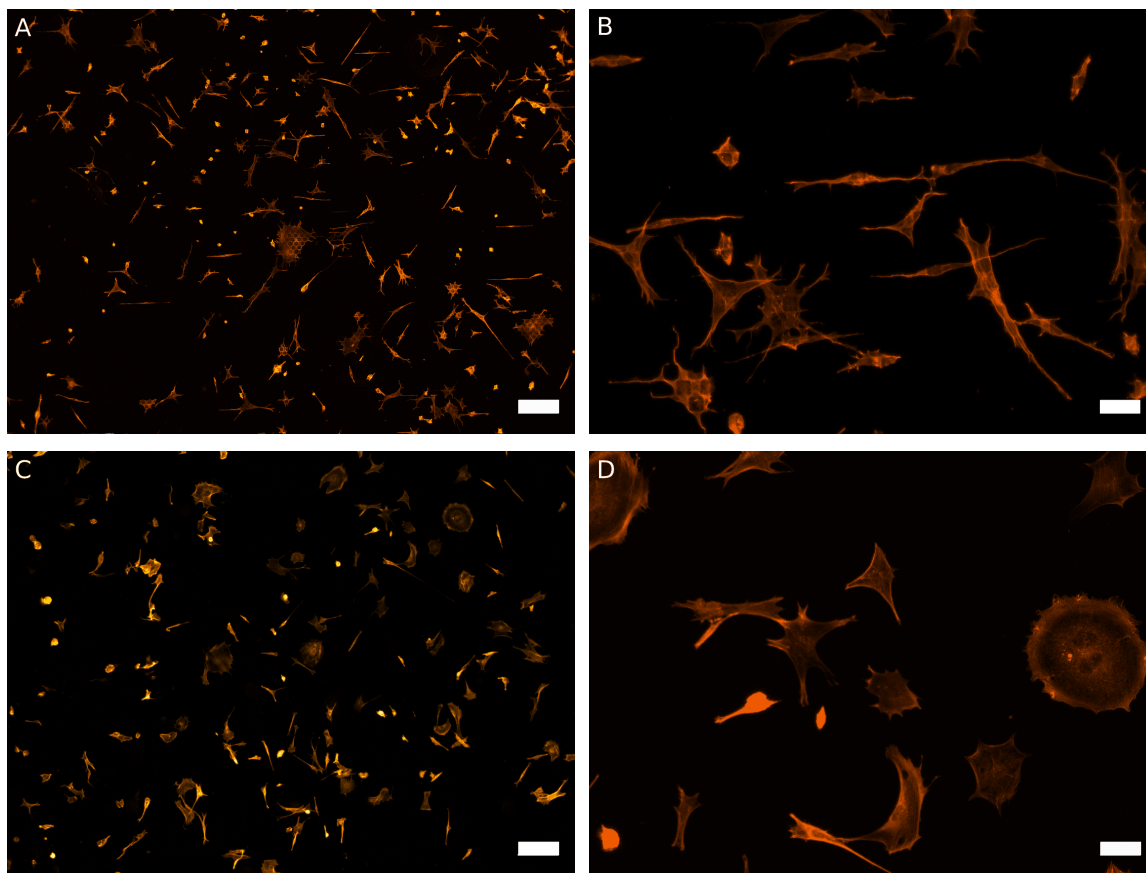


Figura 5.5: Células cultivadas nos substratos lisos e com pilares. Imagens de microscopia de fluorescência, marcação de actina após 24h de cultura celular. Imagens (A) e (B) células cultivadas no substrato com pilares. Imagens (C) e (D) células cultivadas no substrato liso. Escalas: (A) e (C) 200 μm , (B) e (D) 50 μm .

Observa-se que as células formam mais filopódios na superfície composta por pilares do que na superfície lisa Fig.5.6 (setas brancas). Esses filamentos promovem a adesão e migração celular [38]. Neste trabalho, observa-se que os filopódios formados alinham-se com as diagonais (setas verdes) e arestas horizontais dos pilares (setas azuis).

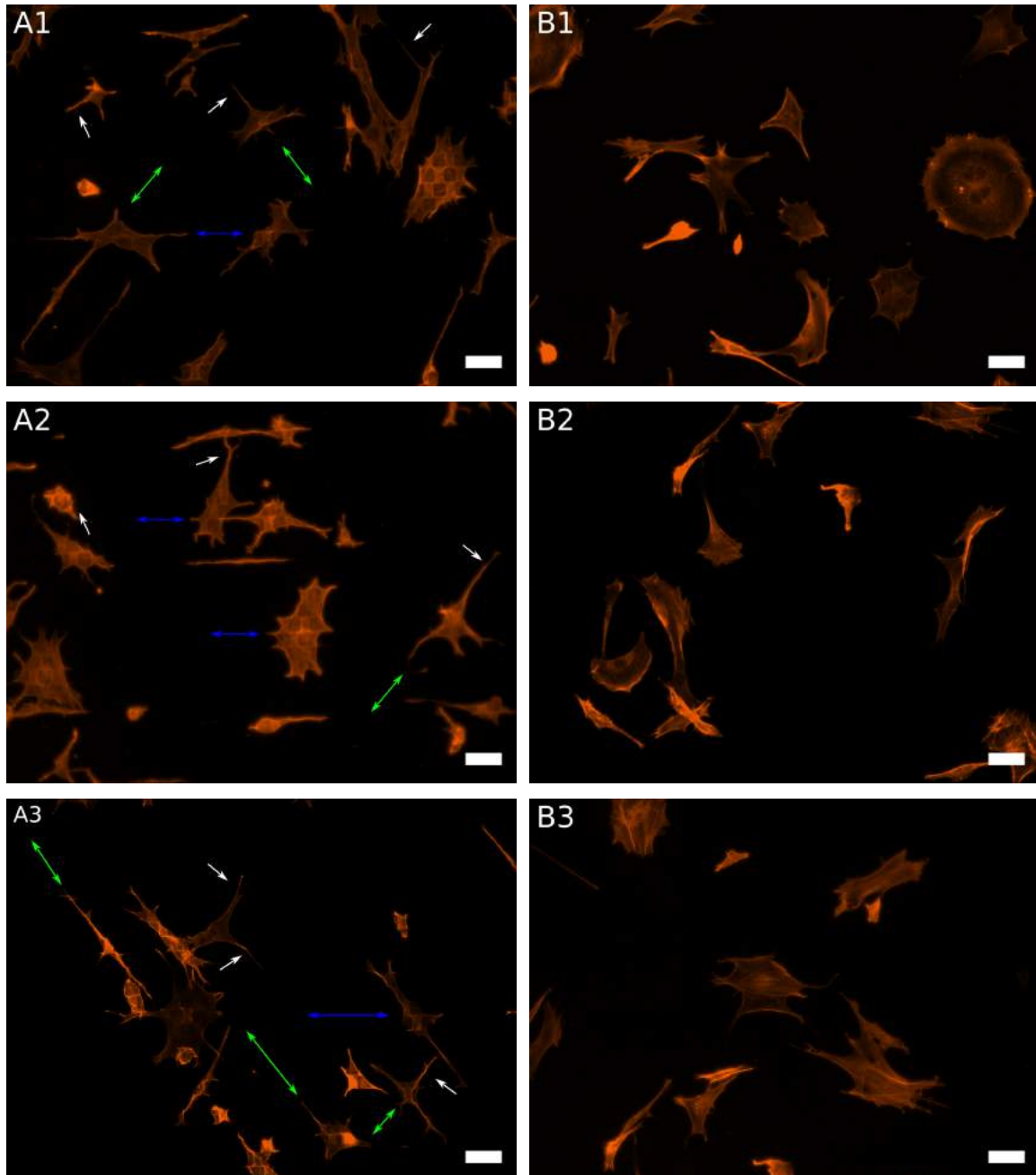


Figura 5.6: Marcação de actina após 24h de cultura celular. Imagens da coluna (A) células cultivadas nos substratos com pilares. Imagens da coluna (B) células cultivadas nos substratos lisos. As setas brancas indicam os filopódios das células, a setas verdes indicam a direção com a diagonal dos pilares, e as setas azuis indicam a direção das arestas horizontais dos pilares. Escala: 50 μm .

Uma hipótese para o observado é que as direções diagonais (setas verdes) e horizontais (seta azul) possuem menor espaçamento (seta preta) entre os pilares, Fig.5.7, e isso favorece a formação de prolongamentos ao longo dessas direções. Comportamento análogo foi observado para outros tipos celulares cultivados em micropilares [39–41].

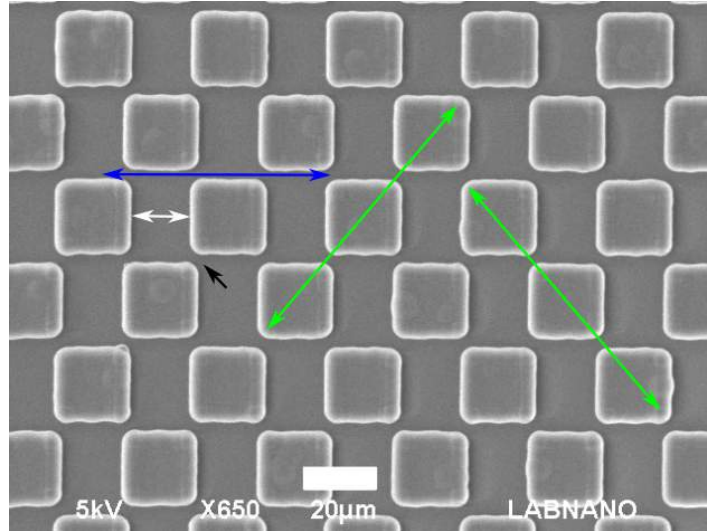


Figura 5.7: A figura esquematiza a direção preferencial dos filopódios sobre os pilares. As setas verdes indicam as diagonais dos pilares, a seta azul indica a direção da aresta horizontal dos pilares, a seta preta indica o menor espaçamento entre os pilares e a branca indica o maior espaçamento entre os pilares. Escala: 20 μm .

5.2.3 Medidas morfológicas

A análise da variância da morfologia celular para células cultivadas nos substratos lisos e com pilares foi feita através da distribuição das medianas das medidas morfológicas para os diferentes campos de imagem analisados Fig.5.8. A escolha da mediana para as análises descritivas se deu como forma de contornar os valores discrepantes presentes nos dados (e.g. células muito grandes, ou muito pequenas, células não aderidas).

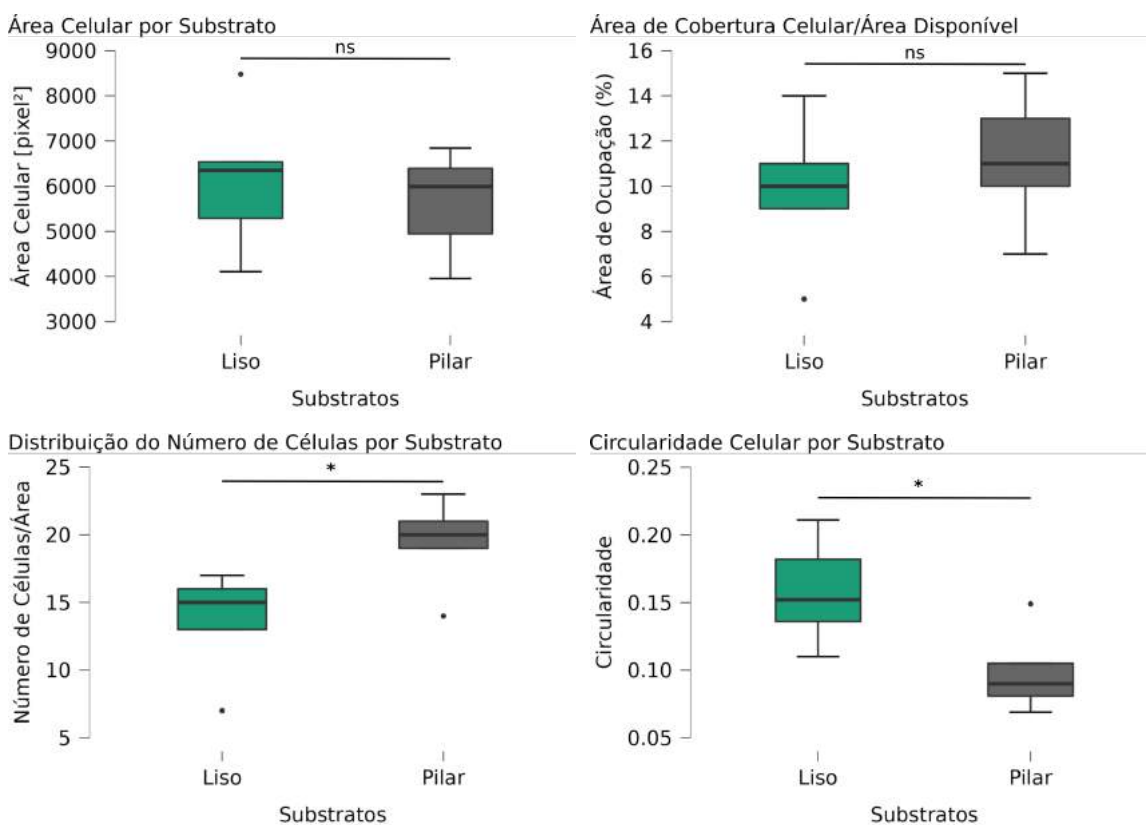


Figura 5.8: Análise dos dados morfológicos para diferentes substratos (* $p < 0.05$ através do teste One-Way ANOVA).

A partir das análises apresentadas na Fig.5.8 observa-se que não há diferença estatística significativa entre a área das células cultivadas nos substratos lisos ou nos pilares, mas há diferença no número de células presentes nos diferentes substratos. Assim como observado nos dados de viabilidade, o substrato composto por pilares possui maior número de células presentes. Nota-se que a circularidade das células também muda com o substrato, as células cultivadas nos substratos lisos possuem circularidade maior do que as células cultivadas nos substratos com pilares. Isso se deve ao fato das células cultivadas nos pilares formarem mais filopódios do que as células cultivadas no substrato liso, Fig.5.6. A formação dos filopódios promove um aumento significativo do perímetro celular sem que isso se traduza num aumento significativo na área da célula, diminuindo assim o valor da circularidade.

5.2.4 MEV mineralização

A Fig.5.9 mostra imagens de microscopia eletrônica de varredura após 7 dias de cultura celular. Nota-se que a substrato composto por pilares está coberto por uma camada de células, indicando boa adesão das mesmas sobre o substrato. Análises por

EDX e transmissão serão feitas (não descritas neste trabalho) a fim de avaliar o material depositado pelas células sobre o substrato e verificar se houve mineralização celular.

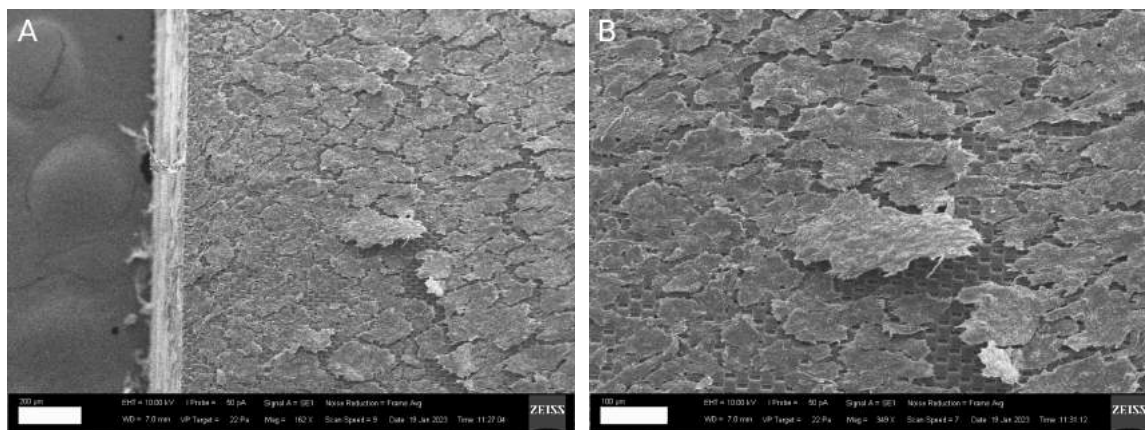


Figura 5.9: MEV após 7 dias de cultura celular. Escala: (A) 200 μm , (B) 100 μm .

6 Conclusão

Este projeto de mestrado teve como objetivo desenvolver um protocolo para fabricação de microestruturas biocompatíveis apropriadas para o estudo *in vitro* do comportamento celular. Para isso, técnicas usuais de microfabricação como deposição via *sputtering*, fotolitografia e *soft-lithography*, foram empregadas na fabricação de microestruturas de baixo custo de produção, atendendo às demandas dos experimentos de cultura celular em pesquisas biomédicas. Diferentes microestruturas foram produzidas com o intuito de estudar os efeitos das topografias em processos celulares específicos, como o de mineralização de células osteoblastos.

As microestruturas tridimensionais produzidas em PDMS com geometria na forma de sulcos retilíneos e pilares de base quadrada mostraram boa reprodutibilidade em relação ao desenho original. Os testes de viabilidade celular mostraram que as microestruturas fabricadas em PDMS são biocompatíveis, permitindo assim a sua aplicação em experimentos de cultura celular.

No presente trabalho, os experimentos com as células osteoblásticas F-OST cultivadas sobre microestruturas compostas por pilares apresentaram maior viabilidade do que as células cultivadas em substrato liso. Uma explicação para o observado é que as superfícies com pilares possuem área superficial maior, favorecendo a formação de mais pontos de adesão celular quando comparado ao substrato liso. Isso indica que a porosidade contribui para a proliferação e mobilidade celular em substratos inertes.

Também verificou-se que as microtopografias influenciaram tanto a morfologia quanto a orientação da migração celular. As células cultivadas em microtopografias apresentaram maior formação de filopódios, conferindo um maior aspecto dendrítico quando comparado às células cultivadas em substratos lisos. Também observou-se que as células apresentaram tendência de formar filopódios orientados com as diagonais e arestas horizontais dos pilares, provavelmente em função do menor espaçamento entre os pilares ao longo dessas direções.

Como trabalhos futuros sugere-se dar continuidade ao estudo da influência das microporosidades no processo de mineralização celular, e aplicação das técnicas apresentadas no desenvolvimento de modelos que simulam o microambiente celular através da fabricação de meios de cultura 3D e dispositivos microfluídicos. Tais modelos permitirão a elaboração de experimentos mais avançados nas áreas de testagem de novos medicamentos, pesquisas relacionadas ao câncer, estudo de células tronco, entre outros.

Referências

- [1] N. Gui, W. Xu, D. E. Myers, R. Shukla, H. P. Tang, and M. Qian. The effect of ordered and partially ordered surface topography on bone cell responses: a review. *Biomater. Sci.*, 6:250–264, 2018.
- [2] M. Rahmati, E. A. Silva, J. E. Reseland, C. A. Heyward, and H. J. Haugen. Biological responses to physicochemical properties of biomaterial surface. *Chemical Society Reviews*, 49(15):5178–5224, 2020.
- [3] D. Kubies, L. Himmllová, T. Riedel, E. Chánová, K. Balík, M. Douderova, J. Bártová, and V. J. P. R. Pesakova. The interaction of osteoblasts with bone-implant materials: 1. the effect of physicochemical surface properties of implant materials. *Physiological Research*, 60(1):95, 2011.
- [4] C. Frantz, K. M. Stewart, and V. M. Weaver. The extracellular matrix at a glance. *Journal of Cell Science*, 123(24):4195–4200, 2010.
- [5] A. D. Theocharis, S. S. Skandalis, C. Gialeli, and N. K. Karamanos. Extracellular matrix structure. *Advanced drug delivery reviews*, 97:4–27, 2016.
- [6] F. Martino, A. R. Perestrelo, V. Vinarský, S. Pagliari, and G. Forte. Cellular mechanotransduction: From tension to function. *Frontiers in Physiology*, 9:824, 2018.
- [7] J. D. Humphrey, E. R. Dufresne, and M. A. Schwartz. Mechanotransduction and extracellular matrix homeostasis. *Nature reviews Molecular cell biology*, 15(12):802–812, 2014.
- [8] A. Carvalho, A. Pelaez-Vargas, D. J. Hansford, M. H. Fernandes, and F. J. Monteiro. Effects of line and pillar array microengineered sio2 thin films on the osteogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Langmuir*, 32(4):1091–1100, 2016.
- [9] K. Vining and D. Mooney. Mechanical forces direct stem cell behaviour in development and regeneration. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 18:728–742, 2017.
- [10] M. Böhner, G. Baroud, A. Bernstein, A. Döbelin, L. Galea, B. Hesse, R. Heuberger, S. Meille, P. Michel, B. von Rechenberg, J. Sague, and H. Seeherman. Characteri-

- zation and distribution of mechanically competent mineralized tissue in micropores of β -tricalcium phosphate bone substitutes. *Materials Today*, 20(3):106–115, 2017.
- [11] J. Rodrigues, M. A. Heinrich, L. M. Teixeira, and J. Prakash. 3d in vitro model (r) evolution: unveiling tumor–stroma interactions. *Trends in cancer*, 7(3):249–264, 2021.
- [12] G. M. Whitesides, E. Ostuni, S. Takayama, X. Jiang, and D. E. Ingber. Soft lithography in biology and biochemistry. *Annual review of biomedical engineering*, 3(1):335–373, 2001.
- [13] S. A Langhans. Three-dimensional in vitro cell culture models in drug discovery and drug repositioning. *Frontiers in pharmacology*, 9:6, 2018.
- [14] R. Edmondson, J. J. Broglie, A. F Adcock, and L. Yang. Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors. *Assay and drug development technologies*, 12(4):207–218, 2014.
- [15] Da Jung Jung, Tae Hoon Shin, Minsuh Kim, Chang Ohk Sung, Se Jin Jang, and Gi Seok Jeong. A one-stop microfluidic-based lung cancer organoid culture platform for testing drug sensitivity. *Lab Chip*, 19:2854–2865, 2019.
- [16] T. C. von Erlach, S. Bertazzo, Michele A. Wozniak, C. M. Horejs, S. A. Maynard, S. Attwood, B. K. Robinson, H. Autefage, C. Kallepitis, A. del Río Hernández, C. S. Chen, S. Goldoni, and M. M. Stevens. Cell-geometry-dependent changes in plasma membrane order direct stem cell signalling and fate. *Nature Materials*, 9:237–242, 2018.
- [17] R. Herzer, A. Gebert, U. Hempel, F. Hebenstreit, S. Oswald, C. Damm, O. G. Schmidt, and M. Medina-Sánchez. Rolled-up metal oxide microscaffolds to study early bone formation at single cell resolution. *Small*, 17(12):2005527, 2021.
- [18] O. Hasturk, M. Ermis, U. Demirci, N. Hasirci, and V. Hasirci. Square prism micropillars improve osteogenicity of poly(methyl methacrylate) surfaces. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 29(5):53, 2018.
- [19] P. Laurent, J. Marteau, A. Guignandon, T. Santos, I. Brigaud, P. Chauvy, T. Cloatre, A. Ponche, T. Petithory, P. Rougerie, M. Vassaux, J. Milan, N. Wakhloo, A. Spangenberg, M. Bigerelle, and K. Anselme. Curvotaxis directs cell migration through cell-scale curvature landscapes. *Nature Communications*, 9(1):3995, 2018.

- [20] C. Moerke, P. Mueller, and J.B. Nebe. Sensing of micropillars by osteoblasts involves complex intracellular signaling. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 28(11):171, 2017.
- [21] T. Vordemvenne, D. Wähnert, J. Koettnitz, M. Merten, N. Fokin, A. Becker, B. Büker, A. Vogel, D. Kronenberg, R. Stange, G. Wittenberg, J. Greiner, A. Hütten, C. Kaltschmidt, and B. Kaltschmidt. Bone regeneration: A novel osteoinductive function of spongostan by the interplay between its nano-and microtopography. *Cells*, 9(3):654, 2020.
- [22] Chang Lei, Y. Cao, S. Hosseinpour, F. Gao, J. Liu, J. Fu, R. Staples, S. Ivanovski, and C. Xu. Hierarchical dual-porous hydroxyapatite doped dendritic mesoporous silica nanoparticles based scaffolds promote osteogenesis in vitro and in vivo. *Nano Research*, 14(3):770–777, 2021.
- [23] C. Kim, J. W. Lee, J. H. Heo, C. Park, D. H. Kim, G. S. Yi, H. C. Kang, H. S. Jung, H. Shin, and J. H. Lee. Natural bone-mimicking nanopore-incorporated hydroxyapatite scaffolds for enhanced bone tissue regeneration. *Biomaterials research*, 26(1):1–13, 2022.
- [24] L. E. Rustom, M. J. Poellmann, and A. J. W. Johnson. Mineralization in micropores of calcium phosphate scaffolds. *Acta Biomaterialia*, 83:435–455, 2019.
- [25] E. Ostuni, S. Takayama, X. Jiang, and D. E. Ingber. Soft lithography in biology and biochemistry. *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, 3:335–73, 2001.
- [26] N. Sahu, B. Parija, and S. Panigrahi. Fundamental understanding and modeling of spin coating process: A review. *Indian Journal of Physics*, 83(4):493–502, 2009.
- [27] J. S. Martins, B. G. A. L. Borges, R. C Machado, A. G. Carpanez, R. M. Grazul, F. Zappa, W. S. Melo, M. L. M. Rocco, R. R. Pinho, and C. R. A. Lima. Evaluation of chemical kinetics in positive photoresists using laser desorption ionization. *European polymer journal*, 59:1–7, 2014.
- [28] Microchemicals GmbH. Hardbake of Photoresist Structures. https://www.microchemicals.com/technical_information/hardbake_photoresist.pdf, 2013. Acessado em Fevereiro de 2023.
- [29] K. R. Williams, K. Gupta, and M. Wasilik. Etch rates for micromachining processing-part ii. *Journal of microelectromechanical systems*, 12(6):761–778, 2003.

- [30] S. Gilles. Chemical modification of silicon surfaces for the application in soft lithography. 2007.
- [31] J. A. Rogers and R. G. Nuzzo. Recent progress in soft lithography. *Materials Today*, 8(2):50–56, 2005.
- [32] P. Kim, Keon W. Kwon, M. C. Park, Sung H. Lee, S. M. Kim, and K. Y. Suh. Soft lithography for microfluidics: a review. *Biochip J*, 2(1):1–11, 2008.
- [33] A. Balduino, S. Hurtado, P. Frazão, C. Takiya, L. Alves, L. Nasciutti, M. El-Cheikh, and R. Borojevic. Bone marrow subendosteal microenvironment harbours functionally distinct haemosupportive stromal cell populations. *Cell and tissue research*, 319(2):255–266, 2005.
- [34] S. A. MacIsaac, T. J. Mullin, Sebastian Munoz, C. C. Ontiveros, and G. A. Gagnon. Immersive ultraviolet disinfection of e. coli and ms2 phage on woven cotton textiles. *Scientific Reports*, 12:13260, 2022.
- [35] C. Hsiao, H. Cheng, C. Huang, H. Li, M. Ou, J. Huang, K. Khoo, H. Wenshin Yu, Y. Chen, Y. Wang, A. Chiou, and J. Kuo. Fibronectin in cell adhesion and migration via n-glycosylation. *Oncotarget*, 8(41):70653–70668, 2017.
- [36] D. Khang, J. Lu, C. Yao, K. M. Haberstroh, and T. J. Webster. The role of nanometer and sub-micron surface features on vascular and bone cell adhesion on titanium. *Biomaterials*, 29(8):970–983, 2008.
- [37] F.J. O’Brien, B.A. Harley, I.V. Yannas, and L.J. Gibson. The effect of pore size on cell adhesion in collagen-gag scaffolds. *Biomaterials*, 26(4):433–441, 2005.
- [38] P. K. Mattila and P. Lappalainen. Filopodia: molecular architecture and cellular functions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(6):446–454, 2008.
- [39] Y. Alapan, M. Younesi, O. Akkus, and U. A. Gurkan. Anisotropically stiff 3d micropillar niche induces extraordinary cell alignment and elongation. *Advanced healthcare materials*, 5(15):1884–1892, 2016.
- [40] M. Park, E. Oh, J. Seo, M. Kim, H. Cho, J. Choi, H. Lee, and I. Choi. Control over neurite directionality and neurite elongation on anisotropic micropillar arrays. *Small*, 12(9):1148–1152, 2016.

- [41] O. Hasturk, A. Sivas, B. Karasozen, U. Demirci, N. Hasirci, and V. Hasirci. Quantification of type, timing, and extent of cell body and nucleus deformations caused by the dimensions and hydrophilicity of square prism micropillars. *Advanced Healthcare Materials*, 5(23):2972–2982, 2016.