

**(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: <b>2012.09.17</b>	(73) Titular(es): <b>INSTITUT CURIE</b>	
(30) Prioridade(s): <b>2011.09.19 FR 1158317</b>	<b>26, RUE D'ULM 75005 PARIS</b>	<b>FR</b>
(43) Data de publicação do pedido: <b>2014.07.30</b>	<b>SOCIÉTÉ DE DEVELOPPEMENT ET DE</b>	<b>FR</b>
(45) Data e BPI da concessão: <b>2015.08.26</b> <b>204/2015</b>	<b>RECHERCHE INDUSTRIELLE</b>	<b>FR</b>
	<b>CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE</b>	<b>FR</b>
	<b>SCIENTIFIQUE (CNRS)</b>	<b>FR</b>
	(72) Inventor(es):	
	<b>MAËL LE BERRE</b>	<b>FR</b>
	<b>MATTHIEU PIEL</b>	<b>FR</b>
	<b>YANJUN LIU</b>	<b>FR</b>
	(74) Mandatário:	
	<b>ALBERTO HERMÍNIO MANIQUE CANELAS</b>	
	<b>RUA VÍCTOR CORDON, 14 1249-103 LISBOA</b>	<b>PT</b>

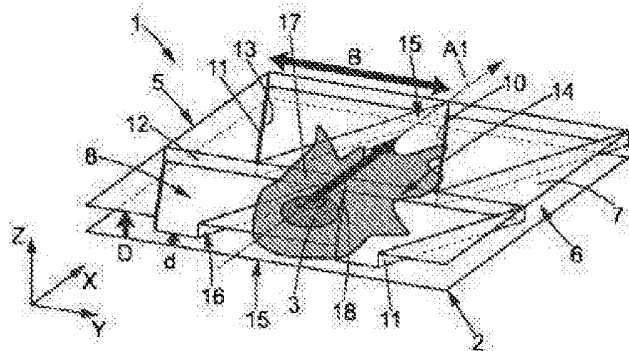
(54) Epígrafe: **DISPOSITIVO PARA DIRECCIONAMENTO DA MIGRAÇÃO CELULAR E MÉTODO DE DIRECCIONAMENTO DA MIGRAÇÃO CELULAR USANDO TAL DISPOSITIVO**

(57) Resumo:

UM DISPOSITIVO DE DIRECCIONAMENTO (1) NO QUAL AS CÉLULAS (3) ESTÃO CONFINADAS ENTRE UMA SUPERFÍCIE SUPORTE (2) E UMA SUPERFÍCIE TEXTURADA (6) DE UM SUBSTRATO (5), A REFERIDA SUPERFÍCIE TEXTURADA (6) TENDO UMA ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL ANISOTRÓPICA (8) APRESENTANDO UM MOTIVO DE REPETIÇÃO QUE SE REPETE SEGUNDO UM EIXO DE REPETIÇÃO (X), O REFERIDO MOTIVO DE REPETIÇÃO APRESENTANDO UMA SUCESSÃO DE ESPAÇOS DE DIRECCIONAMENTO (15), ADJACENTES UNS AOS OUTROS SEGUNDO O EIXO DE REPETIÇÃO (X), CADA UM DOS REFERIDOS ESPAÇOS DE DIRECCIONAMENTO (15) ESTANDO ADAPTADO PARA RECEBER PELO MENOS UMA PARTE DAS CÉLULAS (3) E ORIENTADO SEGUNDO UMA DIRECCÃO DE ANISOTROPIA (A1) PARA GUIAR UM MOVIMENTO DAS CÉLULAS (3) NA DIRECCÃO DE ANISOTROPIA (A1).

**RESUMO****"DISPOSITIVO PARA DIRECCIONAMENTO DA MIGRAÇÃO CELULAR E  
MÉTODO DE DIRECCIONAMENTO DA MIGRAÇÃO CELULAR USANDO TAL  
DISPOSITIVO"**

Um dispositivo de direccionamento (1) no qual as células (3) estão confinadas entre uma superfície suporte (2) e uma superfície texturada (6) de um substrato (5), a referida superfície texturada (6) tendo uma estrutura tridimensional anisotrópica (8) apresentando um motivo de repetição que se repete segundo um eixo de repetição (X), o referido motivo de repetição apresentando uma sucessão de espaços de direccionamento (15), adjacentes uns aos outros segundo o eixo de repetição (X), cada um dos referidos espaços de direccionamento (15) estando adaptado para receber pelo menos uma parte das células (3) e orientado segundo uma direcção de anisotropia (A1) para guiar um movimento das células (3) na direcção de anisotropia (A1).



**DESCRIÇÃO****"DISPOSITIVO PARA DIRECCIONAMENTO DA MIGRAÇÃO CELULAR E  
MÉTODO DE DIRECCIONAMENTO DA MIGRAÇÃO CELULAR USANDO TAL  
DISPOSITIVO"**

A invenção está relacionada com um dispositivo de direccionamento da migração celular e com um método de direccionamento da migração celular usando tal dispositivo.

Em particular, a invenção está relacionada com um dispositivo de direccionamento da migração celular compreendendo uma superfície suporte provida de células e um substrato, o referido substrato apresentando uma superfície texturada colocada face à superfície suporte e colocada em contacto com as células na superfície suporte.

A migração das células é essencial para numerosos processos fisiológicos como a organogénese ou a cicatrização de feridas. No seu ambiente natural, a direcção e a velocidade de migração das células são guiadas por numerosos sinais que podem ser químicos (quimiocinas) ou físicos (microambiente).

*In vitro*, estes fenómenos podem ser reproduzidos ou alterados para impor uma direcção de migração às células usando, por exemplo, quimioatratantes, campos eléctricos ou ainda modulando o ambiente mecânico da célula.

O documento EP-A-1199354 descreve, por exemplo, a formação de um motivo de células sobre uma superfície para um controlo químico da migração de células. Com efeito, no documento EP-A-1199354, a superfície é tratada de forma a apresentar um pré-motivo constituído por compostos que favorecem o desenvolvimento de células e outros compostos que não favorecem o desenvolvimento de células. A cultura de células é em seguida iniciada sobre este pré-motivo. No entanto, a eficácia do controlo da migração das células por este tipo de sistema depende principalmente da escolha dos compostos químicos que favorecem ou impedem o desenvolvimento celular em função da natureza das células cultivadas.

O documento US 2007/0009572 descreve, por sua vez, um método de preparação de um filme biodegradável, micro- ou nano-texturado, compreendendo canais cuja largura pode variar entre 10  $\mu\text{m}$  e 160  $\mu\text{m}$ , no qual são depositadas células musculares. Os ensaios realizados mostram que as células musculares se alinham umas relativamente às outras ao longo dos canais, e cuja morfologia se modifica para tomar uma forma alongada. Este método não tem por finalidade fazer migrar as células numa direcção preferida, mas apenas favorecer o seu alinhamento, umas relativamente às outras, para obter um empilhamento celular regular.

O documento US 2009/02481445 descreve igualmente um método para guiar o direccionamento de células segundo

uma estrutura tridimensional usando uma superfície compreendendo um microcanal, ou uma série de microcanais paralelos uns aos outros, cuja largura é superior à das células, para que as células aí se possam introduzir e cuja secção é arbitrária. Como para o documento anterior, este método não tem por finalidade fazer migrar as células numa direcção preferida, mas apenas favorecer o seu alinhamento, umas relativamente às outras.

Mahmud *et al.* (Nature Physics 2009, 4, pp 606) propõe motivos adesivos na forma de lingueta ("ratchet") para guiar a migração celular. O efeito observado baseou-se num contraste de adesão entre as partes adesivas dos canais e as partes não adesivas de um substrato de modo que, quando a qualidade do contraste entre as partes adesivas e não adesivas se degrada com o tempo, o direccionamento da migração celular deixa de se observar. Por outro lado, a adesão aos canais, lineares ou apresentando uma forma de lingueta ("ratchet"), não permite manter as células sem ser nestes motivos adesivos, ou seja numa única dimensão no espaço, e não permite, por exemplo, a organização de um tecido numa superfície em duas dimensões. Finalmente, os motivos descritos em Mahmud *et al.* são sempre projecções perpendiculares ao plano constituído pela superfície que veicula as células.

Estes métodos que permitem alterar os fenómenos naturais de migração celular podem igualmente encontrar aplicações *in vivo*.

O documento US 2009/0093879 propõe essencialmente um implante apresentando na superfície motivos tridimensionais micrométricos ou nanométricos. Estes motivos permitem principalmente controlar a adesão de microrganismos ou fibroblastos à superfície do implante quando este é colocado num ser vivo, melhorando assim a cicatrização de ferimentos. Este documento US 2009/0093879 sugere que as microestruturas ou nanoestruturas de superfície possam guiar as células que iniciam a cicatrização, permitindo-lhes assim organizarem-se de forma ordenada na superfície do implante.

Ora, tal controlo da migração celular segundo uma determinada direcção poderá igualmente apresentar aplicações no domínio médico, para além da organização forçada à volta de um implante, como sejam a migração dirigida das células na superfície de uma ferida ou a produção de órgãos artificiais em engenharia de tecidos.

Existe pois a necessidade de novos dispositivos que permitam guiar as células na sua migração segundo uma direcção escolhida, cuja eficácia não dependa do tipo de célula móvel considerada, simples de implementar, pouco invasivos para os tecidos e robustos no tempo.

Por guiar a migração celular entende-se, no contexto do presente pedido, que se imponha às células migrar preferencialmente mais numa direcção que nas outras. Por

outras palavras, o direccionamento da migração segue a simetria de migração segundo a direcção considerada. O "direccionamento" da migração difere da "orientação" da migração celular onde as células migram preferencialmente em duas direcções opostas, sem que uma destas direcções seja favorecida relativamente à outra.

Para este efeito, a invenção propõe um dispositivo de direccionamento da migração celular compreendendo uma superfície suporte das células e um substrato, o referido substrato apresentando uma superfície texturada colocada em frente da superfície suporte e em contacto com as células na superfície suporte, de modo que as células fiquem confinadas entre a superfície suporte e a superfície texturada, a referida superfície texturada sendo uma estrutura tridimensional anisotrópica apresentando um motivo de repetição segundo um eixo de repetição, o referido motivo de repetição apresentando uma sucessão de espaços de direccionamento adjacentes segundo o eixo de repetição, cada um dos referidos espaços estando adaptado para receber pelo menos uma parte de uma das células e orientado segundo uma direcção de anisotropia para guiar um deslocamento das células na direcção de anisotropia.

Assim, o dispositivo de direccionamento de acordo com a invenção pode assegurar um controlo da migração das células por intermédio de uma estrutura particular, no seio da qual as células confinadas são recebidas e deslocadas numa direcção (um sentido privilegiado), independentemente

do tipo de célula utilizado. Por conseguinte, o dispositivo de direccionamento é pouco invasivo pois baseia-se na aplicação de uma superfície texturada sobre uma superfície suporte. Finalmente, o dispositivo de direccionamento pode ser obtido de forma simples, através de uma simples texturização de superfície, realizável em série por moldagem.

Ainda, contrariamente aos documentos de trabalhos anteriores descrevendo canais ou microcanais obrigando ao alinhamento das células, a presente invenção permite direccionar a células segundo uma direcção de anisotropia, formando assim uma rede no plano compatível com a organização de um tecido segundo uma determinada superfície.

O dispositivo de direccionamento segundo a invenção pode encontrar aplicações particularmente nos domínios da dermatologia, da implantologia ou da engenharia de tecidos.

Por "estrutura anisotrópica" ou "estrutura com geometria anisotrópica" entende-se, no contexto do presente pedido, uma estrutura cuja geometria possui uma direcção de anisotropia determinada segundo um dado eixo. A direcção da anisotropia da estrutura anisotrópica é particularmente, no quadro da presente invenção, a direcção preferencial da migração das células.

A superfície texturada pode compreender uma superfície de base e a estrutura tridimensional anisotrópica

pode compreender uma pluralidade de pares de superfícies de direccionamento, os referidos pares de superfícies de direccionamento sendo adjacentes uns aos outros segundo o eixo de repetição e definindo o motivo de repetição, cada um dos pares compreendendo a primeira e a segunda superfícies de direccionamento que se estendem acima da superfície de base, frente a frente, e que delimita entre elas um dos espaços de direccionamento.

Em particular, a estrutura tridimensional anisotrópica pode compreender uma pluralidade de elementos de direccionamento sobressaindo relativamente à superfície de base, os referidos elementos de direccionamento sendo adjacentes uns relativamente aos outros segundo o eixo de repetição e cada um possuindo uma das primeiras superfícies de direccionamento e uma das segundas superfícies de direccionamento, a primeira superfície de direccionamento de um dos elementos de direccionamento estando em frente da segunda superfície de direccionamento do elemento de direccionamento adjacente.

Numa realização, a primeira e a segunda superfície de direccionamento de cada par estão adaptadas para que a direcção de anisotropia se estenda de acordo com o eixo de repetição. Em cada um dos pares de superfícies de direccionamento, a primeira superfície de direccionamento pode então ser adaptada para bloquear o deslocamento das células numa direcção oposta à segunda superfície de direccionamento e a segunda superfície de direccionamento

pode ser adaptada para permitir o deslocamento das células numa direcção oposta à primeira superfície de direccionamento, de maneira que a direcção de anisotropia seja orientada da primeira superfície para a segunda superfície. Para tal, a primeira superfície de direccionamento pode ser perpendicular ao eixo de repetição e a segunda superfície de direccionamento pode deflectir da primeira superfície de direccionamento segundo o eixo de repetição.

Em particular, numa primeira variante, a segunda superfície de direccionamento pode ser perpendicular à superfície de base e apresentar uma concavidade virada para a primeira superfície de direccionamento. Por exemplo, a estrutura tridimensional anisotrópica pode compreender uma pluralidade de filas de projecções triangulares adjacentes segundo o eixo de repetição, cada uma das referidas filas compreendendo pelo menos duas projecções alinhadas segundo um eixo transversal perpendicular ao eixo de repetição, cada um dos espaços de direccionamento compreendendo uma cavidade sensivelmente triangular com uma base formada sobre a primeira superfície de direccionamento de uma das filas de projecções triangulares e um vértice formado sobre a segunda superfície de direccionamento da fila de projecções triangulares adjacentes.

Numa segunda variante, a primeira superfície de direccionamento pode ser perpendicular ao eixo de repetição e a segunda superfície de direccionamento pode ser

inclinada relativamente a um plano perpendicular à superfície de base.

Num outro modo de realização, a primeira e a segunda superfícies de direccionamento de cada par estão adaptadas para que a direcção de anisotropia se estenda de acordo com um eixo transversal perpendicular ao eixo de repetição. Em cada um dos pares de superfícies de direccionamento, a primeira e a segunda superfície de direccionamento podem ser então adaptadas para bloquear o deslocamento de células numa ou noutra das direcções do eixo de repetição. Em particular, a estrutura tridimensional anisotrópica pode compreender uma pluralidade de projecções estendidas adjacentes segundo o eixo de repetição, cada uma das referidas projecções estendidas segundo o eixo transversal, cada um dos espaços de direccionamento compreendendo uma ranhura entre a primeira superfície de direccionamento de uma das projecções estendidas e a segunda superfície de direccionamento da projecção estendida adjacente.

Por outro lado, o espaço de direccionamento pode apresentar uma dimensão máxima, medida entre a primeira e a segunda superfícies de direccionamento, inferior a 200  $\mu\text{m}$ , de preferência inferior a 100  $\mu\text{m}$ , principalmente correspondendo sensivelmente ao tamanho das células, por exemplo compreende entre 5  $\mu\text{m}$  e 60  $\mu\text{m}$ , de preferência entre 15  $\mu\text{m}$  e 30  $\mu\text{m}$ . O espaço de direccionamento pode igualmente apresentar uma profundidade inferior a 200  $\mu\text{m}$ , de

preferência inferior a 100  $\mu\text{m}$ , principalmente inferior ao tamanho das células, por exemplo inferior a 6  $\mu\text{m}$ .

O substrato pode ser não adesivo. Neste caso, pode ser constituído por um material não adesivo como seja um polímero fluorado ou um material tornado não adesivo através de tratamento químico, como seja acoplagem de moléculas de polietilenoglicol (PEG). A superfície texturada não adesiva, ou seja à qual as células não possam aderir, pode portanto ser retirada sem risco de deteriorar as células.

Numa variação, o substrato pode ser adesivo.

Além disso, a superfície suporte sobre a qual se deslocam as células pode ser uma superfície artificial, como seja uma superfície de cultura celular (por exemplo um gel), uma lamela de vidro, o interior de um canal microfluídico ou uma superfície do ambiente natural das referidas células como seja a superfície de um tecido vivo ou a superfície de uma ferida.

A superfície suporte e a superfície texturada podem estar espaçadas por uma distância entre 0  $\mu\text{m}$  e 10  $\mu\text{m}$ , de preferência entre 3  $\mu\text{m}$  e 6  $\mu\text{m}$ .

Pelo menos uma das superfícies escolhidas entre a superfície e a superfície texturada pode compreender pelo menos uma projecção suplementar permitindo controlar a

distância entre a superfície suporte e a superfície texturada. Em particular, a projecção suplementar pode-se apresentar sob a forma de um pilar de diâmetro compreendido entre 100  $\mu\text{m}$  e 500  $\mu\text{m}$ , e altura inferior a 10  $\mu\text{m}$ , de preferência entre 3  $\mu\text{m}$  e 6  $\mu\text{m}$ .

De acordo com aplicações particulares, o dispositivo de direccionamento pode-se apresentar sob a forma de um penso, implante, prótese, suporte de tecidos artificiais, canal microfluídico, laboratório em chip integrando canais e, de preferência, o referido dispositivo de direccionamento é um penso.

De acordo com um outro aspecto, a invenção propõe um método de direccionamento da migração celular através da implementação de um dispositivo de direccionamento como atrás definido, o referido método de direccionamento prevê o contacto das células colocadas sobre a superfície suporte com a superfície texturada do substrato, de forma que as células fiquem confinadas entre a superfície suporte e a superfície texturada, as células deslocando-se na direcção da anisotropia.

#### Descrição das figuras

Outros objectivos e vantagens da invenção surgirão da leitura da descrição das realizações particulares da invenção que se segue, dadas a título de exemplos não limitantes, a descrição sendo feita com referência aos desenhos anexados, nos quais:

- a figura 1 é uma representação em perspectiva de uma primeira realização de um substrato de um dispositivo de direcção de migração celular, o substrato apresentando uma superfície texturada provida de uma pluralidade de filas de projecções triangulares definindo uma sucessão de cavidades de direcção triangulares adjacentes segundo um eixo de repetição, as cavidades de direcção estando adaptadas para guiar um deslocamento de células existentes numa superfície suporte numa das direcções do eixo de repetição,

- a figura 2 é uma representação da vista inferior do substrato da figura 1 cuja superfície texturada está colocada em frente de uma superfície suporte num dispositivo de direcção, a figura 2 ilustra o deslocamento de uma célula entre uma superfície suporte e a superfície texturada do substrato,

- a figura 3 é uma representação em perspectiva do detalhe referenciado III na figura 2, na direcção do deslocamento da célula,

- a figura 4A é uma imagem em contraste de fase das células confinadas sob as projecções triangulares e a figura 4B é um histograma do enviesamento induzido na direcção de migração das células,

- a figura 5 é uma representação em corte do dispositivo de direcção compreendendo um substrato

de acordo com uma variante da primeira realização da figura 1, o substrato apresentando uma superfície texturada provido de uma pluralidade de projecções estendidas definindo uma sucessão de ranhuras de direccionamento adjacentes segundo o eixo de repetição, as ranhuras de direccionamento guiam o deslocamento das células existentes na superfície suporte numa direcção do eixo de repetição.

- a figura 6 é uma representação em perspectiva de uma segunda realização de um substrato de um dispositivo de direccionamento da migração celular, o substrato apresentando uma superfície texturada provida de uma pluralidade de projecções estendidas definindo uma sucessão de ranhuras de direccionamento adjacentes segundo um eixo de repetição, as ranhuras de direccionamento estando adaptadas para guiar um deslocamento de células existentes numa superfície suporte numa das direcções de um eixo perpendicular ao eixo de repetição.

- a figura 7 é uma representação da vista inferior do substrato da figura 1 cuja superfície texturada está colocada em frente a uma superfície suporte num dispositivo de direccionamento, a figura 5 ilustrando o deslocamento de uma célula entre uma superfície suporte e a superfície texturada do substrato.

#### Descrição detalhada

Nas figuras, as mesmas referências designam elementos idênticos ou análogos.

As figuras representam um dispositivo de direccionamento 1 da migração celular compreendendo uma superfície suporte 2 provida de células 3 e um substrato 5 adaptado para guiar o deslocamento de células segundo um eixo e numa das duas direcções privilegiadas do eixo.

De acordo com uma realização preferida, o substrato 5 é não adesivo, ou seja as células não podem aderir ao substrato 5, de forma, como é aparente de acordo com a descrição, a poder retirar o substrato 5 da superfície suporte 2 sem deteriorar as células. Tal substrato 5 não adesivo é igualmente designado substrato anti-incrustação (ou "anti-fouling" de acordo com a terminologia anglo-saxónica).

O carácter não adesivo do substrato 5 corresponde a uma fraca capacidade de adsorção proteica do substrato 5 assim como uma fraca capacidade de adesão celular, o que permite, de um modo geral, limitar as reacções inflamatórias.

Os materiais não adesivos adequados ao substrato 5 não adesivo podem ser principalmente super-hidrófobos - como é o caso dos polímeros fluorados (por exemplo, politetrafluoroetileno (PTFE)) - ou géis como a poliacrilamida (PAM) ou o polietilenoglicol-diacrilato (PEGDA).

Como alternativa, o substrato 5 não adesivo pode

ser constituído por um material tornado não adesivo através do tratamento químico.

Os tratamentos químicos que podem tornar o substrato 5 não adesivo podem particularmente ser acoplagem ao substrato de uma camada de gel monomolecular, por exemplo do tipo polietilenoglicol (PEG), por exemplo um PEG silanizado nos óxidos ou tiolado nos metais ou conjugado com um polielectrólito para lhe conferir a capacidade de adsorver duravelmente, através da electrostática, ao substrato 5, como é o caso para a acoplagem de Polilisina-PEG (PLL-PEG).

De preferência, o material não adesivo é um polímero fluorado ou um material tornado não adesivo através do tratamento químico, como seja a acoplagem de moléculas, por exemplo com polietilenoglicol (PEG).

O substrato 5 pode, no entanto, especialmente em função da aplicação na qual o dispositivo de direccionamento é aplicado, ser adesivo.

Os materiais adesivos susceptíveis de serem adequados ao substrato adesivo 5 podem, particularmente, ser hidrófilos ou hidrófobos, sendo este o caso tratados com um promotor de adesão celular particularmente escolhido entre:

- os plásticos biocompatíveis: por exemplo, o

polistireno (PS), de rotina usado em culturas celulares, polímeros siliconados como a polidimetilsiloxana (PDMS) especialmente utilizados nos laboratórios em chips, géis de copolímeros em bloco como o estireno-etileno/butileno-estireno (SEBS) utilizados para a produção de pensos ou os poliácidos lácticos e glicólicos (PLGA, PLA: hidrófilo) que são biodegradáveis e podem ser utilizados para implantes ou como suporte de tecidos artificiais; alguns destes plásticos podem, vantajosamente, ser activados por plasma de oxigénio para aumentar a sua hidrofília e promover a adesão celular,

- as cerâmicas, geralmente hidrófilas, como seja os óxidos metálicos ou os nitretos, como por exemplo o vidro ( $\text{SiO}_2$ ), o nitreto de silício ( $\text{Si}_3\text{N}_4$ ), o dióxido de titânio ( $\text{TiO}_2$ ) ou outros; estes materiais são utilizados em cultura celular, nos laboratórios em chip ou em implantologia; estes materiais podem vantajosamente ser activados por plasma de oxigénio para aumentar a sua hidrofília e promover a adesão celular,

- os metais inertes como o ouro, a platina, o paládio ou os metais cuja superfície oxidada ou azotada é estável, como o crómio ou o titânio, que são usados para os implantes; vantajosamente, os metais podem ser tratados com moléculas da família dos tióis para aumentar ou reduzir a sua capacidade de adesão celular.

Por conseguinte, é possível promover a adesão

celular, através do tratamento químico de um material de suporte. Pode-se então utilizar:

- polímeros carregados (polieletrólitos) que adsorvem fortemente por interacção electrostática em superfície oxidadas (naturalmente como para os óxidos ou artificialmente activando as superfícies com a ajuda de um plasma de oxigénio): por exemplo a poli-L-lisina (PLL) ou a poli-ornitina (PORN); ou

- proteínas de adesão celular (integrinas) ou da matriz extracelular (fibronectina, laminina, colagénio) ou péptidos que mimetizam estas proteínas, como seja o motivo RGD (arginina-glicina-ácido aspártico).

É igualmente possível, no contexto da presente invenção, modular a adesão do substrato 5 para otimizar a motilidade das células. Com efeito, o nível de adesão das células sobre um substrato 5 pode ser modulado através do tratamento deste substrato com uma mistura racionométrica de moléculas adesivas e de moléculas não adesivas. Por exemplo, pode ser utilizada uma mistura de pLL-PEG e de pLL-PEG-RGD ou uma mistura de pLL-PEG e fibronectina.

O substrato 5 apresenta uma superfície texturada 6 tendo uma superfície de base 7 e uma estrutura tridimensional anisotrópica 8, visível na figura 1 e representada à transparência da superfície da base 7 nas figuras 2 e 3. A estrutura tridimensional anisotrópica 8

compreende uma pluralidade de elementos de direccionamento salientes relativamente à superfície da base 7 segundo um eixo vertical Z perpendicular à superfície de base 7. Os elementos de direccionamento são arrançados sobre a superfície da base 7 de forma adjacente uns relativamente aos outros segundo um eixo de repetição X, perpendicular ao eixo vertical Z. Nas figuras, o substrato 5 está representado como um plano com uma descrição correspondente aos eixos para clarificar o direccionamento e o posicionamento relativo de elementos do substrato 5. Como é evidente do que foi dito e como será evidente na sequência da descrição, e principalmente das aplicações do dispositivo de direccionamento 1, o substrato 5 pode, no entanto, ser deformável e apresentar qualquer outra configuração além da configuração plana representada.

No primeiro modo de realização representado nas figuras 1 a 3, cada elemento de direccionamento apresenta-se na forma de uma fila 10 de projecções triangulares. Cada fila 10 compreende cinco projecções triangulares 11, alinhadas segundo um eixo transversal Y perpendicular ao eixo de repetição X e ao eixo vertical Z. Noutras realizações, cada fila 10 pode compreender duas, três, quatro ou mais de cinco projecções triangulares 11.

Cada projecção triangular 11 apresenta uma base 12 e um vértice 13. Em cada fila 10, as bases 12 formam uma primeira superfície de direccionamento 14, perpendicular à superfície de base 7 e ao eixo de repetição X e os vértices

13 formam uma segunda superfície de direccionamento 16, perpendicular à superfície da base 7 e apresentando uma sucessão de concavidades formadoras de um trilho dentado.

A primeira superfície de direccionamento 14 de uma das filas de projecções triangulares 10 é colocada em frente à segunda superfície de direccionamento 16 da fila de projecções triangulares 10 adjacente. As projecções triangulares 11 de duas filas 10 adjacentes possuem, por conseguinte, as suas bases 12 e os seus vértices 13 alinhados. As filas de projecções triangulares 10 formam assim, entre elas, uma pluralidade de pares de superfície de direccionamento, adjacentes uns aos outros segundo o eixo de repetição X e definem um motivo de repetição segundo este eixo de repetição X.

Cada um dos pares de superfícies de direccionamento compreende uma das primeiras superfícies de direccionamento 14 e a segunda superfície de direccionamento 16 em frente, delimitando entre elas um espaço de direccionamento. No primeiro modo de realização, o espaço de direccionamento compreende uma pluralidade de cavidades 15, sensivelmente triangulares, cada uma com uma base 17 formada sobre a primeira superfície de direccionamento 14 de uma das filas de projecções triangulares 10 e um vértice 18 formado sobre a segunda superfície de direccionamento 16 da fila de projecções triangulares 10 adjacente. Em particular, para cada cavidade 15, a base 17 é formada por partes das bases 12 de duas projecções triangulares 11 de

uma das filas 10 e o vértice 18 é formado por duas paredes laterais convergindo uma para a outra de duas projecções triangulares 11 da fila 10 adjacente. O motivo de repetição apresenta pois uma sucessão de cavidades 15 segundo o eixo de repetição X.

Cada uma das cavidades 15 está adaptada para receber pelo menos uma parte de uma das células 3. A cavidade 15 apresenta uma dimensão máxima, medida entre a primeira superfície 14 e a segunda superfície 16 de direccionamento, inferior a 200  $\mu\text{m}$ , de preferência inferior a 100  $\mu\text{m}$ . Vantajosamente, a dimensão máxima da cavidade 15 corresponde sensivelmente ao tamanho das células 3 e está, por exemplo, compreendida entre 5  $\mu\text{m}$  e 60  $\mu\text{m}$ , de preferência entre 15  $\mu\text{m}$  e 30  $\mu\text{m}$ . A cavidade 15 apresenta, por outro lado, uma profundidade, medida perpendicularmente à superfície da base 7, inferior a 200  $\mu\text{m}$ , de preferência inferior a 100  $\mu\text{m}$ . Vantajosamente, a profundidade da cavidade é inferior ao tamanho das células 3, por exemplo inferior a 20  $\mu\text{m}$ , ou ainda inferior a 6  $\mu\text{m}$ . Por exemplo, cada uma das cavidades 15 possui uma profundidade de 2  $\mu\text{m}$  e é realizada sob a forma de um triângulo equilátero cujo lado B mede 32  $\mu\text{m}$ , ou seja uma distância máxima entre a primeira superfície 14 e a segunda superfície 16 de direccionamento de 27,71  $\mu\text{m}$ .

No modo de realização representado, as projecções triangulares 11 estão representadas ligadas umas às outras no seio de uma mesma fila 10 e entre duas filas 10

adjacentes. Lacunas entre as projecções triangulares 11 poderão, no entanto, ser previstas especialmente para adaptar a dimensão da cavidade 15. Além disso, cada fila 10 foi representada com uma pluralidade de cavidades 15, sendo entendido que cada fila 10 poderá compreender uma única cavidade 15.

Uma tal estrutura tridimensional poderá ser realizada, por exemplo, por fotolitografia, facultativamente seguido de uma etapa de gravura ou por qualquer processo de microfabricação.

Relativamente às figuras 2 e 3, descreve-se um método de direcção da migração celular usando o substrato 5 descrito atrás.

A superfície texturada 6 do substrato 5 é colocada em frente à superfície suporte 2 e em contacto com as células 3 colocadas na superfície suporte 2, de forma que as células 3 fiquem confinadas entre a superfície suporte 2 e a superfície texturada 6. O confinamento das células 3 permite reforçar o seu direcção, em particular quando o substrato 5 no qual as células 3 são veiculadas é não adesivo.

A superfície suporte 2 e a superfície texturada 6 estão espaçadas uma distância compreendida entre 0  $\mu\text{m}$  e 10  $\mu\text{m}$ , de preferência entre 3  $\mu\text{m}$  e 6  $\mu\text{m}$ , de modo que a espessura da célula 3 após confinamento estará pelo menos

compreendida entre 3 e 6  $\mu\text{m}$  para permitir a sua migração. A superfície de base 7 do substrato 5 é colocada a uma distância D da superfície suporte 2, por exemplo 5  $\mu\text{m}$ , e as projecções triangulares 11 estão colocadas a uma distância d da superfície 2, inferior à distância D entre a superfície de base 7 e a superfície suporte 2, por exemplo de 3  $\mu\text{m}$ .

A superfície suporte 2 sobre a qual repousam as células 3 pode ser uma superfície artificial como seja uma superfície de cultura celular (por exemplo um gel), uma lamela de vidro, o interior de um canal microfluídico ou uma superfície do ambiente natural das referidas células, como seja a superfície de um tecido vivo ou a superfície de uma ferida.

A partir do momento em que as células são veiculadas sobre um suporte portador da superfície suporte 2 e apresentando uma rigidez superior a cerca de 20 kPa, é desejável, no quadro da presente invenção, que pelo menos uma das superfícies escolhidas entre a superfície suporte 2 e a superfície texturada 6 compreenda pelo menos uma saliência suplementar, não representada, permitindo controlar a distância entre a superfície suporte 2 e a superfície texturada 6 e assim evitar alterar as células 3. A altura destas saliências é medida relativamente à superfície sobre a qual estão dispostas. A saliência suplementar pode-se apresentar sob a forma de um ou mais pilares de diâmetro compreendido entre 100  $\mu\text{m}$  e 500  $\mu\text{m}$ , e

de altura inferior a 10  $\mu\text{m}$ , de preferência entre 3  $\mu\text{m}$  e 6  $\mu\text{m}$ , e em todo o caso, a altura tal como a espessura da célula 3 após confinamento é pelo menos compreendida entre 3 e 6  $\mu\text{m}$ .

Pelo contrário, quando as células são veiculadas sobre um suporte portador da superfície suporte 2 e estão "moles", ou seja com uma rigidez inferior a cerca de 20 kPa, particularmente compreendida entre 100 Pa e 20 kPa, de preferência entre 500 Pa e 10 kPa, não é necessário existir saliências suplementares na medida em que a superfície suporte é suficientemente "frouxa" para permitir às células 3 não serem esmagadas pelo substrato, as células 3 definem o seu espaço de confinamento formando a superfície suporte 2. Estes suportes "moles" são do tipo gel de fraca rigidez ou tapete celular. Os géis utilizados podem ser géis de origem artificial, como seja poliacrilamida (PAM) ou polietilenoglicol-diacrilato (PEGDA) ou ainda géis de origem natural como o colagénio, o matrigel ou o ácido hialurónico (HA). A rigidez destes géis pode ser ajustada pela sua composição e pelas condições da sua reticulação.

Cada cavidade 15 cuja segunda superfície de direccionamento 16 se afasta da primeira superfície de direccionamento 14 segundo o eixo de repetição X, está orientada segundo uma direcção de anisotropia A1 paralela ao eixo de repetição X e dirigida depois da primeira superfície de direccionamento 14 na direcção da segunda superfície 16.

Em cada cavidade 15, a primeira superfície de direccionamento 14 está adaptada para bloquear o deslocamento das células 3 numa direcção oposta à segunda superfície de direccionamento 16 e a segunda superfície de direccionamento 16 está adaptada para autorizar o deslocamento das células 3 numa direcção oposta à primeira superfície de direccionamento 14.

As cavidades 15 podem também guiar um deslocamento das células 3 existentes na superfície suporte 2 na direcção de anisotropia A1, ou seja na direcção do eixo de repetição X indo da base 17 na direcção do vértice 18 da cavidade 15.

A figura 4A é uma imagem de contraste de fase das células confinadas sob as projecções triangulares 10. Os triângulos claros na figura 4A representam as cavidades 15, as projecções triangulares 10 sendo representadas pelos triângulos carregados. A figura 4B é um histograma que dá um enviesamento induzido na direcção de migração de 167 células confinadas sob a estrutura anteriormente descrita, após 24 horas de migração. Nas figuras 4A e 4B, uma seta dá a direcção dos bicos das cavidades 15 triangulares.

O histograma mostra então uma direcção privilegiada de migração correspondendo à direcção segundo a qual as cavidades 15 são orientadas.

O método de direccionamento que acaba de ser descrito utiliza uma superfície texturada 6 cuja estrutura tridimensional 8 onde a textura está enviesada numa direcção, a referida direcção de anisotropia A1, de forma que estas células 3 possam aplicar uma pressão mais facilmente numa direcção (aqui na direcção da segunda superfície de direccionamento 16) que noutra (aqui na direcção da primeira superfície de direccionamento 14) ou possam encaixar-se mais facilmente numa direcção (aqui, na direcção da primeira superfície de direccionamento 14) que noutra (aqui, na direcção da segunda superfície de direccionamento 16) ou possam deformar-se mais facilmente numa direcção (aqui, na direcção da segunda superfície de direccionamento 16) que noutra (aqui, na direcção da superfície de direccionamento 14). Tal anisotropia da interacção entre a célula 3 e o substrato 5 induz uma direcção de migração preferencial, à imagem da estrutura da chamada lingueta Browniana ("Brownian ratchet") atrás descrita.

Na realização anteriormente descrita, a direcção de anisotropia A1 é definida por uma concavidade voltada na direcção da primeira superfície de direccionamento 14 e formada por duas paredes laterais rectilíneas convergindo uma na direcção da outra. Outras formas podem, no entanto, ser previstas para o espaço de direccionamento, de forma a realizar uma concavidade virada na direcção da primeira superfície de direccionamento 14 e, daí, uma direcção de anisotropia A1 paralela ao eixo de repetição X, indo da

primeira superfície de direccionamento 14 para a segunda superfície de direccionamento 16. Por exemplo, a concavidade poderá ser arredondada, sendo particularmente formada por duas paredes laterais curvas convergindo uma para a outra ou por uma única parede lateral curva.

A invenção não está, portanto, limitada à realização de uma concavidade para orientar a direcção de anisotropia A1 paralelamente ao eixo de repetição X, depois da primeira superfície de direccionamento 14 na direcção da segunda superfície de direccionamento 16.

Por exemplo, numa variante representada na figura 5, os elementos de direccionamento são realizados sob a forma de projecções estendidas 20 alongando-se cada uma segundo o eixo transversal Y, perpendicular ao eixo de repetição X. Cada projecção estendida 20 é portadora de uma primeira superfície de direccionamento 24, perpendicular ao eixo de repetição X, e uma segunda superfície de direccionamento 26, inclinada relativamente a um plano perpendicular à superfície de base 7.

Nesta variante, apenas a superfície texturada do substrato 5 difere da anteriormente descrita. A descrição detalhada do substrato 5 e de outros elementos idênticos não será portanto repetida e para mais detalhes será referida a descrição já feita.

Como anteriormente descrito, a primeira super-

fície de direccionamento 24 de uma das projecções estendidas 20 está colocada em frente à segunda superfície de direccionamento 26 da projecção estendida 20 adjacente. As projecções estendidas 20 formam assim, entre elas, uma pluralidade de pares de superfícies de direccionamento adjacentes umas às outras segundo o eixo de repetição X e definem um motivo de repetição segundo este eixo de repetição X.

Cada um dos pares de superfícies de direccionamento compreende uma das primeiras superfícies de direccionamento 24 e a segunda superfície de direccionamento 26 em frente, delimitando entre elas um espaço de direccionamento.

Nesta variante da primeira realização, o espaço de direccionamento compreende uma ranhura 25 que se estende segundo o eixo transversal Y. O motivo de repetição apresenta então uma sucessão de ranhuras 25 segundo o eixo de repetição X. Cada uma das ranhuras 25 está adaptada para receber pelo menos uma parte de uma das células 3. A ranhura 25 apresenta uma dimensão máxima, medida no fundo da ranhura 25 entre a primeira superfície 24 e a segunda superfície 26 de direccionamento, inferior a 200  $\mu\text{m}$ , de preferência inferior a 100  $\mu\text{m}$ . Vantajosamente, a dimensão máxima da ranhura 25 corresponde sensivelmente ao tamanho das células 3 e está, por exemplo, compreendida entre 5  $\mu\text{m}$  e 60  $\mu\text{m}$ , de preferência entre 15  $\mu\text{m}$  e 30  $\mu\text{m}$ . A ranhura 25 apresenta, por conseguinte, uma profundidade, medida

perpendicularmente à superfície de base 7, inferior a 200  $\mu\text{m}$ , de preferência inferior a 100  $\mu\text{m}$ . Vantajosamente, a profundidade da ranhura 25 é inferior a um tamanho das células 3, por exemplo inferior a 20  $\mu\text{m}$ , ou ainda inferior a 6  $\mu\text{m}$ .

Uma tal estrutura tridimensional pode ser realizada, por exemplo, por fotolitografia, facultativamente seguido de uma etapa de gravura anisotrópica tipo RIE, ICP ou DRIE inclinando a amostra quando da fotolitografia ou gravura para obter as faces inclinadas, ou ainda através de fotolitografia na zona dos cinzentos ("Gray-tone lithography").

Como representado na figura 5, cada ranhura 25, cuja segunda superfície de direccionamento se afasta da primeira superfície de direccionamento 24 segundo o eixo de repetição X, está orientada segundo uma direcção de anisotropia A2 paralela ao eixo de repetição X e dirigida após a primeira superfície de direccionamento 24 na direcção da segunda superfície de direccionamento 26. Em cada ranhura 25, a primeira superfície de direccionamento 24 bloqueia o deslocamento das células 3 numa direcção oposta à segunda superfície de direccionamento 26 e a segunda superfície de direccionamento 26 permite o deslocamento das células 3 numa direcção oposta à primeira superfície de direccionamento 24. As ranhuras 25 podem então guiar um deslocamento das células 3 existentes na superfície suporte 2 na direcção de anisotropia A2, ou

seja na direcção do eixo de repetição X indo da primeira superfície de direccionamento 24 na direcção da segunda superfície de direccionamento 26.

As figuras 6 e 7 representam um segundo modo de realização da invenção na qual os espaços de direccionamento 25 estão orientados numa direcção de anisotropia A3a, A3b que se estende segundo o eixo transversal Y, perpendicular ao eixo de repetição X, de forma a guiar o deslocamento das células 3 segundo o eixo transversal Y.

Na segunda realização, apenas a superfície texturizada 6'' do substrato 5 difere da primeira realização anteriormente descrita. A descrição detalhada do substrato 5 e de outros idênticos não será portanto repetida e para mais detalhes será referida a descrição já feita relativamente à primeira realização.

Os elementos de direccionamento são realizados sob a forma das projecções estendidas 30, estendendo-se cada uma segundo o eixo transversal Y. Cada projecção estendida 30 é portadora da primeira superfície de direccionamento 34 e da segunda superfície de direccionamento 26, perpendiculares ao eixo de repetição X.

Como anteriormente descrito, a primeira superfície de direccionamento 34 de uma das projecções estendidas 30 é colocada em frente da segunda superfície de direccionamento 36 da projecção estendida 30 adjacente. As projec-

ções estendidas 30 formam assim, entre elas, uma pluralidade de pares de superfícies de direcionamento adjacentes umas às outras segundo o eixo de repetição X e definem um motivo de repetição segundo este eixo de repetição X.

Cada um dos pares de superfície de direcionamento compreende uma das primeiras superfícies de direcionamento 34 e a segunda superfície de direcionamento 36 em frente, delimitando entre elas um espaço de direcionamento.

Na segunda realização, o espaço de direcionamento compreende uma ranhura 35 que se estende segundo o eixo transversal Y. O motivo de repetição apresenta então uma sucessão de ranhuras 35 segundo o eixo de repetição X. Cada uma das ranhuras 35 está adaptada para receber pelo menos uma parte de uma das células 3. A ranhura 35 apresenta uma dimensão máxima, medida entre a primeira superfície de direcionamento 34 e a segunda superfície de direcionamento 36, inferior a 200  $\mu\text{m}$ , de preferência inferior a 100  $\mu\text{m}$ . Vantajosamente, a dimensão máxima da ranhura 35 corresponde sensivelmente ao tamanho das células 3 e está, por exemplo, compreendido entre 5  $\mu\text{m}$  e 60  $\mu\text{m}$ , de preferência entre 15  $\mu\text{m}$  e 30  $\mu\text{m}$ . A ranhura 35 apresenta, por conseguinte, uma profundidade, medida perpendicularmente à superfície de base 7, inferior a 200  $\mu\text{m}$ , de preferência inferior a 100  $\mu\text{m}$ . Vantajosamente, a profundidade da ranhura 35 é inferior ao tamanho das células 3, por exemplo inferior a 20  $\mu\text{m}$ , ou ainda inferior a 6  $\mu\text{m}$ .

Cada ranhura 35, cuja primeira superfície de direccionamento 34 e a segunda superfície de direccionamento 36 se estendem segundo o eixo transversal Y, pode ser orientada segundo uma das direcções de anisotropia A3a, A3b paralela ao eixo transversal Y de qualquer modo adequado, como por exemplo entalhes ou linguetas dispostos em fila sobre a primeira superfície de direccionamento 34 e a segunda superfície de direccionamento 36 ou sobre o fundo da ranhura 35. Em cada ranhura 35, a primeira superfície de direccionamento 34 e a segunda superfície de direccionamento 36 bloqueiam o deslocamento das células 3 num ou noutra direcção do eixo de repetição X. As ranhuras 35 podem então guiar um deslocamento das células 3 existentes na superfície suporte 2 numa das direcções de anisotropia A3a, A3b.

O dispositivo de direccionamento 1 de acordo com a invenção pode particularmente encontrar numerosas aplicações de direccionamento da migração das células *in vivo* ou *in vitro*.

Entende-se por direccionamento *in vitro*, o direccionamento da migração das células em cultura num meio totalmente artificial. As células podem, por exemplo, ser cultivadas numa superfície suporte artificial, como seja uma placa de cultura celular, a superfície texturada sendo então aplicada sobre a superfície suporte para confinar as células. Numa outra realização, a superfície texturada pode

ser integrada numa das faces de um canal microfluídico para guiar a migração das células no referido canal microfluídico. As superfícies texturadas do dispositivo de acordo com a invenção podem ser utilizadas quer para o estudo dos mecanismos biológico e físicos de migração e de proliferação das células em cultura quer para realizar triagem celular, separando as células de acordo com as suas características de migração. Como alternativa, o dispositivo de acordo com a invenção pode permitir direccionar as células em suportes bidimensionais ou tridimensionais cobertos, pelo menos parcialmente, com uma superfície de direccionamento texturada para a obtenção de órgãos artificiais (engenharia de tecidos). O dispositivo de acordo com a invenção pode encontrar uma aplicação em qualquer domínio que necessite de guiar células artificialmente e independentemente do seu comportamento quimiotáctico.

Entende-se por direccionamento *in vivo*, o direccionamento da proliferação e da migração das células num ser vivo, por exemplo no Homem. Neste caso, a superfície suporte é constituída pelo suporte fisiológico natural das células sobre o qual é aplicada a superfície texturada. De acordo com uma realização preferida do direccionamento *in vivo*, a superfície texturada pode ser utilizada para guiar as células presentes na superfície de uma ferida, de modo a favorecer a repartição das células sobre a ferida. O dispositivo é assim um penso apresentando as microestruturas na sua superfície. De acordo com uma outra realização de direccionamento *in vivo*, a superfície

texturada pode ser utilizada para guiar as células à volta de uma prótese, de forma a favorecer a repartição de células à volta da prótese. De acordo com uma outra realização de direccionamento *in vivo*, a superfície texturada pode ser utilizada para guiar as células à volta de uma película ou de um penso interno colocado no interior do corpo de um ser vivo, de modo a favorecer a repartição das células num ou noutro órgão.

Numa outra aplicação particular, o dispositivo de direccionamento pode, vantajosamente, ser utilizado *in vivo* como penso, para favorecer a cicatrização de uma ferida. Para além da aplicação particularmente vantajosa como penso, o dispositivo de direccionamento de acordo com a invenção encontra aplicações como implante, prótese, suporte de tecidos artificiais, canal microfluídico ou laboratório em chip integrando canais.

Lisboa, 22 de setembro de 2015

## REIVINDICAÇÕES

1. Dispositivo de direccionamento (1) da migração celular compreendendo uma superfície suporte (2) provida de células (3) e um substrato (5), o referido substrato (5) apresentando uma superfície texturada (6; 6'; 6'') colocada em frente da superfície suporte (2) e em contacto com as células (3) colocadas sobre a superfície suporte (2) de modo que as células (3) fiquem confinadas entre a superfície suporte (2) e a superfície texturada (6; 6'; 6''), a referida superfície texturada (6; 6'; 6'') tendo uma estrutura tridimensional anisotrópica (8; 8'; 8'') apresentando um motivo de repetição segundo um eixo de repetição (X), o referido motivo de repetição apresentando uma sucessão de espaços de direccionamento (15; 25; 35) adjacentes segundo o eixo de repetição (X), cada um dos referidos espaços de direccionamento (15; 25; 35) estando adaptado a poder receber pelo menos uma parte de uma das células (3) e orientado segundo uma direcção de anisotropia (A1; A2; A3a, A3b) para guiar o deslocamento das células (3) na direcção de anisotropia (A1; A2; A3a, A3b).

2. Dispositivo de direccionamento (1) de acordo com a reivindicação 1, no qual a superfície texturada (6; 6'; 6'') compreende uma superfície de base (7) e a estrutura tridimensional anisotrópica (8; 8'; 8'') compreendendo uma pluralidade de pares de superfícies de direccionamento, os referidos pares de superfícies de direccionamento sendo

adjacentes uns aos outros segundo o eixo de repetição (X) e definindo o motivo de repetição, cada um dos pares compreendendo a primeira (14; 24; 34) e a segunda (16; 26; 36) superfícies de direccionamento que se estendem acima da superfície de base (7), em frente uma da outra, e que delimitam entre elas um dos espaços de direccionamento (15; 25; 35).

3. Dispositivo de direccionamento (1) de acordo com reivindicação 2, no qual a estrutura tridimensional anisotrópica (8; 8'; 8'') compreende uma pluralidade de elementos de direccionamento (10; 20; 30) erguendo-se relativamente à superfície suporte de base (7), os referidos elementos de direccionamento (10; 20; 30) sendo adjacentes uns aos outros segundo o eixo de repetição (X) e cada um portador de uma das primeiras superfícies de direccionamento (14; 24; 34) e de uma das segundas superfícies de direccionamento (16; 26, 36), a primeira superfície de direccionamento (14; 24; 34) e um dos elementos de direccionamento (10; 20; 30) estando em frente da segunda superfície de direccionamento (16; 26; 36) do elemento de direccionamento (10; 20; 30) adjacente.

4. O dispositivo de direccionamento (1) de acordo com a reivindicação 2 ou 3, na qual a primeira (14; 24) e a segunda (16; 26) superfícies de direccionamento de cada par estão adaptadas para que a direcção de anisotropia (A1; A2) se estenda segundo o eixo de repetição (X).

5. Dispositivo de direccionamento (1) de acordo com a reivindicação 4, no qual, em cada um dos pares de superfícies de direccionamento, a primeira superfície de direccionamento (14; 24) está adaptada para bloquear o deslocamento das células (3) numa direcção oposta à segunda superfície de direccionamento (16; 26) e a segunda superfície de direccionamento (16; 26) está adaptada para permitir o deslocamento das células (3) numa direcção oposta à primeira superfície de direccionamento (14; 24) de modo que a direcção de anisotropia (A1; A2) fique orientada depois da primeira superfície de direccionamento (14; 24) na direcção da segunda superfície de direccionamento (16; 26).

6. Dispositivo de direccionamento (1) de acordo com a reivindicação 5, no qual a primeira superfície de direccionamento (14; 24) é perpendicular ao eixo de repetição (X) e a segunda superfície de direccionamento (16; 26) se desvia da primeira superfície de direccionamento (14; 24) segundo o eixo de repetição (X).

7. Dispositivo de direccionamento (1) de acordo com a reivindicação 6, no qual a segunda superfície de direccionamento (16) é perpendicular à superfície de base (7) e apresenta uma concavidade voltada para a primeira superfície de direccionamento (14).

8. Dispositivo de direccionamento (1) de acordo com a reivindicação 7, no qual a estrutura tridimensional

anisotrópica (8) compreende uma pluralidade de filas de projecções triangulares (10) adjacentes segundo o eixo de repetição (X), cada uma das referidas filas (10) compreendendo pelo menos duas projecções (11) alinhadas segundo um eixo transversal (Y) perpendicular ao eixo de repetição (X), cada um dos espaços de direccionamento compreendendo uma cavidade (15) sensivelmente triangular com uma base (17) formada sobre a primeira superfície de direccionamento (14) e um das filas de projecções triangulares (10) e um vértice (18) formado sobre a segunda superfície de direccionamento (16) da fila de projecções triangulares (10) adjacente.

9. Dispositivo de direccionamento (1) de acordo com a reivindicação 6, na qual a primeira superfície de direccionamento (24) é perpendicular ao eixo de repetição e a segunda superfície de direccionamento (26) está inclinada relativamente a um plano perpendicular à superfície de base (7).

10. Dispositivo de direccionamento (1) de acordo com a reivindicação 2 ou 3, na qual a primeira (34) e a segunda (36) superfície de direccionamento de cada par estão adaptadas para que a direcção de anisotropia (A3a, A3b) se estenda segundo um eixo transversal (Y) perpendicular ao eixo de repetição (X).

11. Dispositivo de direccionamento (1) de acordo com a reivindicação 10, no qual, em cada um dos pares de

superfícies de direccionamento, a primeira (34) e a segunda (36) superfícies de direccionamento estão adaptadas para bloquear o deslocamento das células (3) numa ou noutra das direcções do eixo de repetição (X).

12. O dispositivo de direccionamento (1) de acordo com a reivindicação 11, no qual a estrutura tridimensional anisotrópica (8'') compreende uma pluralidade de projecções estendidas (30) adjacentes segundo o eixo de repetição (X), cada uma das referidas projecções estendidas (30) alongando-se segundo o eixo transversal (Y), cada um dos espaços de direccionamento compreendendo uma ranhura (35) entre a primeira superfície de direccionamento (34) de uma das projecções estendidas (30) e a segunda superfície de direccionamento (36) da projecção estendida (30) adjacente.

13. Dispositivo de direccionamento (1) de acordo com qualquer uma das reivindicações 2 a 12, no qual o espaço de direccionamento (15; 25; 35) apresenta uma dimensão máxima, medida entre a primeira (14; 24; 34) e a segunda (16; 26; 36) superfície de direccionamento), inferior a 200  $\mu\text{m}$ , de preferência inferior a 100  $\mu\text{m}$ , particularmente correspondendo sensivelmente a um tamanho das células (3), por exemplo compreendida entre 5  $\mu\text{m}$  e 60  $\mu\text{m}$ , de preferência entre 15  $\mu\text{m}$  e 30  $\mu\text{m}$ .

14. Dispositivo de direccionamento (1) de acordo com qualquer uma das reivindicações 2 a 13, no qual o

espaço de direccionamento (15; 25; 35) apresenta uma profundidade inferior a 200  $\mu\text{m}$ , de preferência inferior a 100  $\mu\text{m}$ , particularmente inferior a um tamanho das células (3), por exemplo inferior a 6  $\mu\text{m}$ .

15. Dispositivo de direccionamento (1) de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 14, no qual o substrato (5) é não adesivo.

16. Dispositivo de direccionamento (1) de acordo com a reivindicação 15, no qual o substrato (5) não adesivo é constituído por um material não adesivo, como seja um polímero fluorado, ou um material tornado não adesivo através do tratamento químico, como seja por acoplagem de moléculas de polietilenoglicol (PEG).

17. Dispositivo de direccionamento (1) de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 14, no qual o substrato (5) é adesivo.

18. Dispositivo de direccionamento (1) de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 17, no qual a superfície suporte (2) sobre a qual se deslocam as células (3) é uma superfície artificial, como seja uma superfície de cultura celular (por exemplo um gel), uma lamela de vidro, o interior de um canal microfluídico ou uma superfície do ambiente natural das referidas células, como seja a superfície de um tecido vivo ou a superfície de uma ferida.

19. Dispositivo de direcionamento (1) de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 18, no qual a superfície suporte (2) e a superfície texturada (6; 6'; 6'') estão espaçadas por uma distância compreendida entre 0  $\mu\text{m}$  e 10  $\mu\text{m}$ , de preferência entre 3  $\mu\text{m}$  e 6  $\mu\text{m}$ .

20. Dispositivo de direcionamento (1) de acordo com a reivindicação 19, no qual pelo menos uma das superfícies escolhidas entre a superfície suporte (2) e a superfície texturada (6; 6'; 6'') compreende pelo menos uma saliência suplementar que permite controlar a distância entre a superfície suporte (2) e a superfície texturada (6; 6'; 6'').

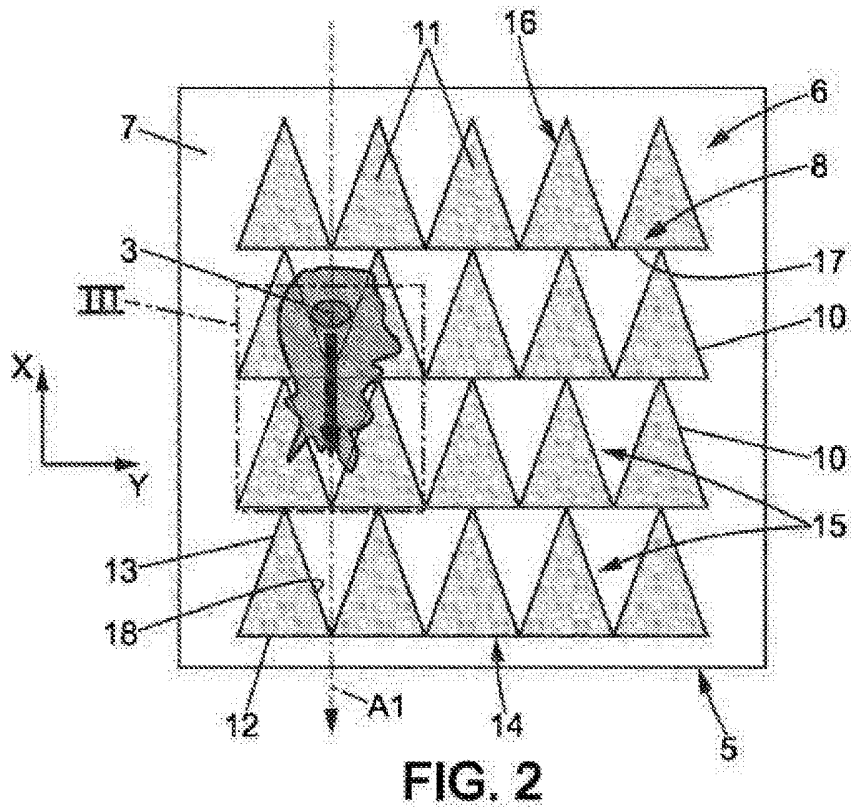
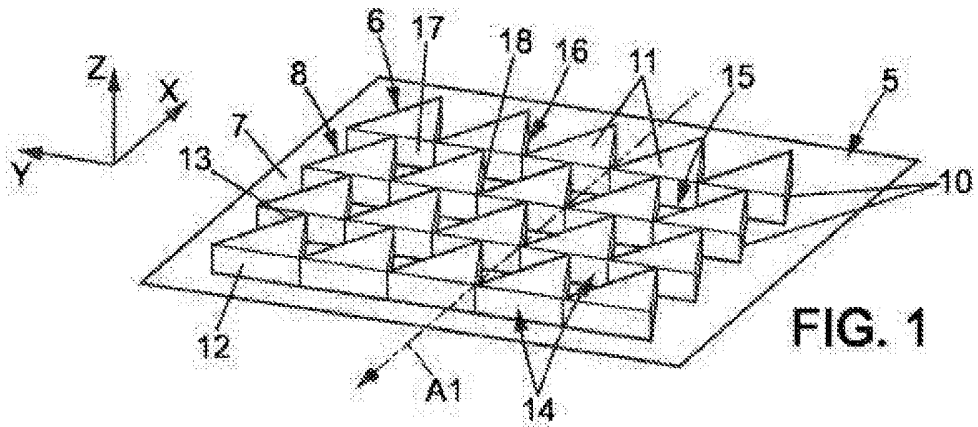
21. Dispositivo de direcionamento (1) de acordo com a reivindicação 20, no qual a saliência suplementar se apresenta sob a forma de um pilar de diâmetro compreendido entre 100  $\mu\text{m}$  e 500  $\mu\text{m}$  e de altura inferior a 10  $\mu\text{m}$ , de preferência entre 3  $\mu\text{m}$  e 6  $\mu\text{m}$ .

22. Dispositivo de direcionamento (1) de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 21, apresentando-se sob a forma de penso, implante, prótese, suporte de tecidos artificiais, canal microfluídico, laboratório em chip integrando canais, e, de preferência, o referido dispositivo de direcionamento (1) é um penso.

23. Método de direcionamento da migração celu-

lar através da utilização de um dispositivo de direccionamento (1) de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 22, o referido método de direccionamento prevendo o contacto de células (3) colocadas sobre a superfície suporte (2) com a superfície texturada (6; 6'; 6'') do substrato (5), de modo que as células (3) fiquem confinadas entre a superfície suporte (2) e a superfície texturada (6; 6'; 6''), as referidas células (3) deslocando-se na direcção de anisotropia (A1; A2; A3a, A3b).

Lisboa, 22 de setembro de 2015



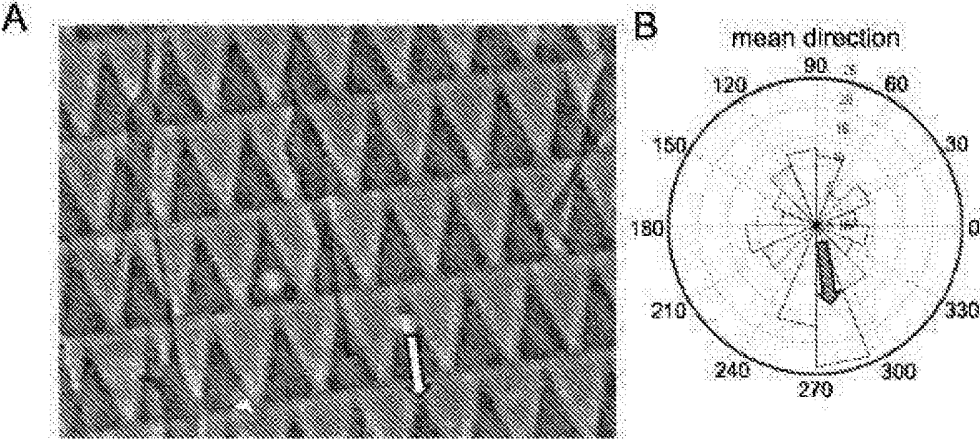
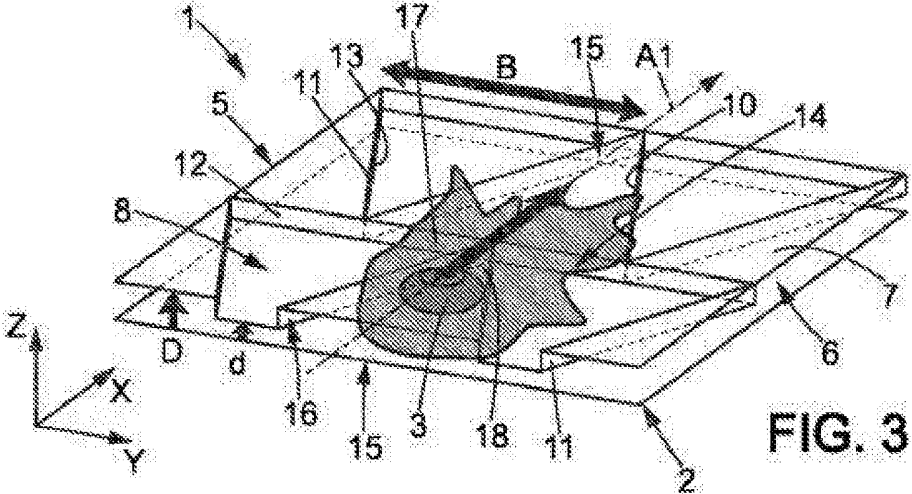
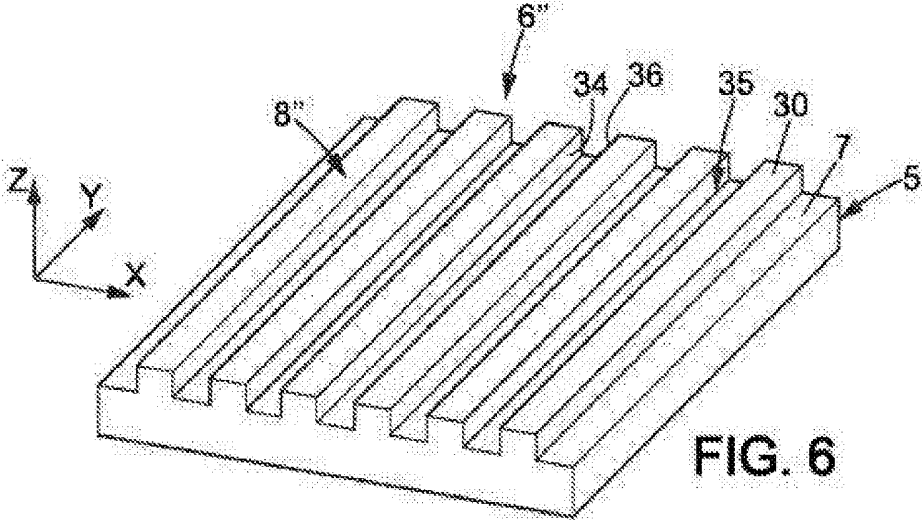
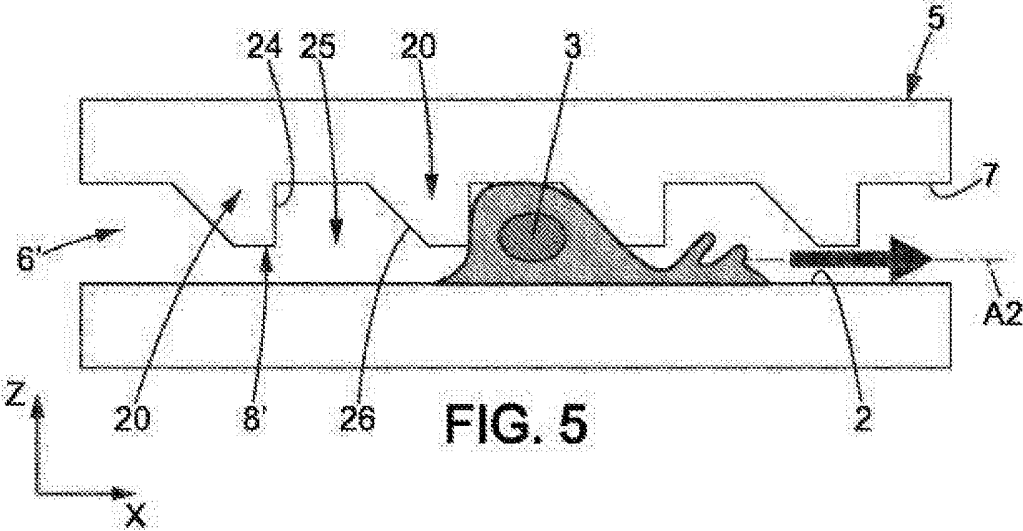


FIG. 4



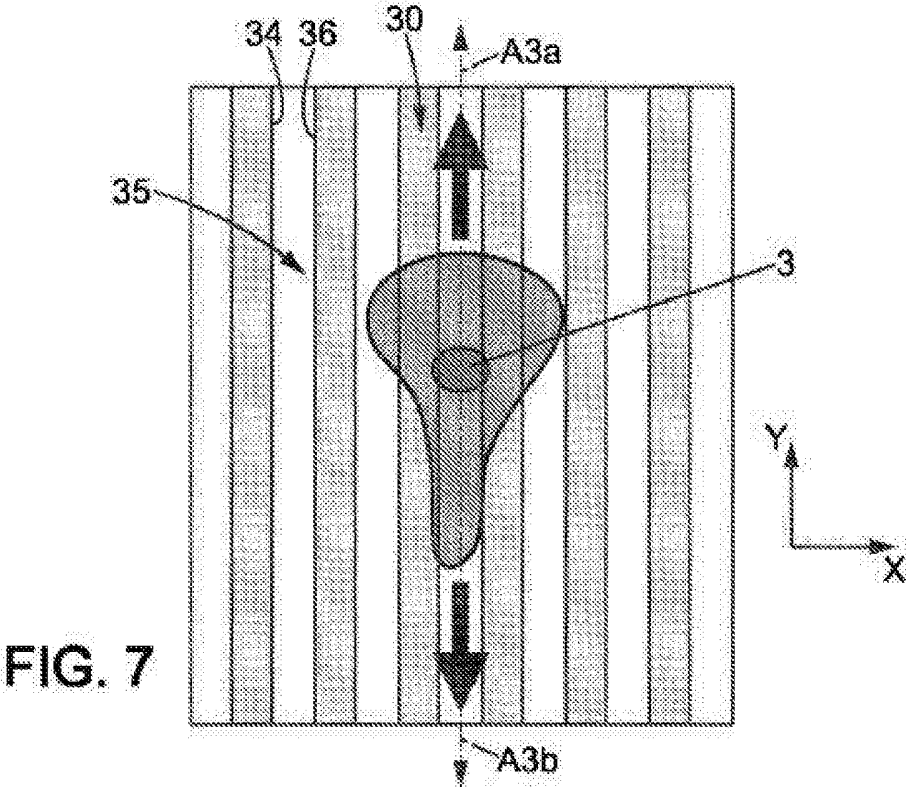


FIG. 7

**REFERÊNCIAS CITADAS NA DESCRIÇÃO**

*Esta lista de referências citadas pelo requerente é apenas para conveniência do leitor. A mesma não faz parte do documento da patente europeia. Ainda que tenha sido tomado o devido cuidado ao compilar as referências, podem não estar excluídos erros ou omissões e o IEP declina quaisquer responsabilidades a esse respeito.*

**Documentos de patentes citadas na Descrição**

- \* EP 1199354 A
- \* US 20070009572 A
- \* US 20090248144S A
- \* US 20090038079 A

**Literatura que não é de patentes citada na Descrição**

- \* MAHMUD et al. *Nature Physics*, 2009, vol. 4, 696