

Análise *in silico* da influência de marcadores biológicos para o desenvolvimento de tecido ósseo em ambiente *scaffold-free*.

Bianca C. dos Santos*, Pedro A. Noritomi, Jorge V.L. Silva, Bruna M. Manzini, Izaque A. Maia.

{*bcsantos, pnoritom, jorge.silva, bmanzini,
izaque.maia}@cti.gov.br

Divisão de Acompanhamento e Apoio a Políticas em Tecnologia Social (DiPTS)
CTI/MCTI Renato Archer – Campinas/SP

Abstract: *Bone tissue is largely affected by traumas and degenerative diseases, and the current treatments available are highly invasive and often ineffective. Tissue engineering is a possible alternative, within regenerative medicine, to reduce the morbidity and mortality of patients affected with bone problems. The aim of this work is to computationally analyze the markers involved in osteogenesis. For model simulations, the CompuCell 3D software was used, which showed a good correlation between cell development and proliferation and the interference of each marker with data from the literature, showing that computer simulation is a useful tool for osteogenesis and for tissue engineering.*

Resumo: *O tecido ósseo é muito afetado por traumas e doenças degenerativas, e os tratamentos disponíveis geralmente são invasivos e ineficazes. A engenharia de tecidos é uma possível alternativa, dentro da medicina regenerativa, para redução da morbi-mortalidade dos pacientes acometidos com problemas ósseos. O objetivo deste trabalho é analisar computacionalmente os marcadores envolvidos na osteogênese intramembranosa. Para as simulações dos modelos, foi utilizado o software CompuCell 3D, que mostrou uma boa correlação do desenvolvimento e proliferação celular e da interferência de cada marcador com dados experimentais da literatura, mostrando que a simulação computacional é uma ferramenta útil para osteogênese e para engenharia de tecidos.*

1. Introdução.

O tecido ósseo está sujeito a sofrer traumas e fraturas pelas mais diversas razões. No Brasil, este é um grave problema de saúde pública, tendo como importante causa os acidentes de trânsito e quedas, resultando em cerca de 1,25 milhões de mortes por ano, no mundo (1). Além disso, o osso é muito afetado por doenças que causam deformidades ou levam a sua degeneração, como é o caso da osteoporose, tumores, doença de Paget ou osteoartrite (2). Atualmente, as enfermidades ósseas representam, mundialmente, cerca de 50% das doenças crônicas desenvolvidas em indivíduos com idade igual ou superior a 50 anos e estima-se que, com o aumento da expectativa de vida, as estatísticas continuem crescendo (3).

O tecido ósseo tem grande importância clínica, porque garante funções de suporte, proteção, assistência ao movimento, homeostasia mineral, produção de células

sanguíneas e armazenamento de triglicerídeos (4). É constituído por uma fase mineral (50-70%), formada principalmente por cristais de fosfato de cálcio (hidroxiapatita), água (5-10%) e lipídios (<3%), e uma fase orgânica, formada principalmente por fibras de colágeno do tipo I, e proteínas não colágenas, como citocinas, fatores de crescimento e proteoglicanos (5). Essa combinação entre fase mineral e orgânica compactua com as propriedades únicas que tornam o osso muito resistente às tensões mecânicas após seu desenvolvimento (6).

1.1. Crescimento Ósseo.

O crescimento do osso é um processo dinâmico e contínuo e pode ocorrer de duas maneiras diferentes: endocondral, que envolve alterações na cartilagem hialina e a morte de condrócitos, e a intramembranosa, foco deste trabalho. A osteogênese intramembranosa tem início com o recrutamento das células tronco mesenquimais para os locais de regeneração (5). A medula óssea foi à primeira fonte descoberta que provém células tronco mesenquimais (MSCs), sendo que essas células são ativadas no desenvolvimento ósseo, com a função de migrar para os locais de reabsorção do tecido e se diferenciarem em osteoblastos. Estes últimos quando maduros estão envolvidos na secreção, maturação e mineralização da matriz inicial (5). Com o desenvolvimento da matriz, os osteoblastos podem se diferenciar em osteócitos, podem morrer por apoptose ou ainda se tornarem células de revestimento ósseo. Os osteócitos têm como função a regulação dos componentes químicos da matriz, já os osteoclastos derivam da linhagem monócito-macrófago, e apresentam como principal característica a reabsorção do osso, com liberação de enzimas que digerem proteínas e liberam seus fragmentos (5).

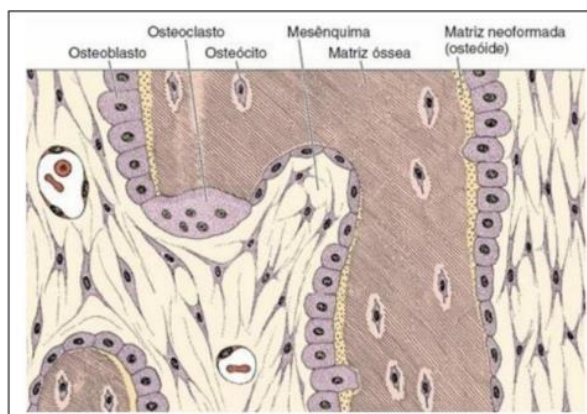


Figura 1: Representação das células óssea (2).

Todas estas células têm papel fundamental no reparo do tecido ósseo (6). Esse processo compreende duas fases, sendo elas: a remoção do osso danificado, realizada pelos osteoclastos (processo de reabsorção), e a formação de osso novo (osteoblastos) (5). Entretanto, o processo de auto reparo ósseo apresenta limitações como o tempo, e a possibilidade desse novo tecido não corrigir totalmente o dano. Além disso, lesões complexas e extensas tendem a não regenerar de forma adequada. Em crianças saudáveis, uma extremidade fraturada cresce mais rapidamente do que o lado normal, e pode-se esperar uma perda de 1 a 1,5 cm de comprimento ósseo. Em adultos normais, o tempo para que ocorra uma regeneração óssea adequada é de cerca de três a cinco meses, onde o paciente sente dores constantes e precisa estar em repouso em grande parte do tempo.

Durante esse período em que ocorre o processo de regeneração óssea, uma série de fatores bioquímicos, que auxiliam na interação entre as células estão envolvidos, como é o caso das citocinas que são peptídeos que exercem a função de comunicação do sistema imunológico. Algumas das substâncias associadas ao desenvolvimento do osso são: *Runt-related transcription factor 2* (RUNX2), fator estimulante de colônias de macrófagos (M-CSF), *Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand* (RANKL), Osteocalcina, dentre outras. O RUNX2 é um fator de transcrição essencial para diferenciação das células-tronco mesenquimais em pré-osteoblastos no osso endocondral, e posteriormente para agir nos osteoblastos (7). Além disso, o M-CSF é uma citocina que atua na diferenciação das unidades formadoras de colônias granulócito-monócito (CFU-GM) em célula precursora de osteoclastos. Atua também na diferenciação dos osteoclastos, que dependem além de M-CSF, de sinalizações de RANKL (8). O RANKL age no osso para diferenciação dos osteoclastos, sendo produzido pelas células do estroma, e pelos osteócitos. Ele pode estar associado à membrana ou ser eliminado para formação de uma proteína solúvel, e neste último caso, contribui para a remodelação óssea (9). A osteocalcina é um peptídeo secretado por osteoblastos maduros e é depositada na matriz óssea, na forma de cristais de hidroxiapatita. Uma pequena quantidade vai para circulação, sendo um marcador da atividade osteoblástica, que está associado com a diferenciação dos osteoclastos (10).

Tabela 1: Principais fatores bioquímicos envolvidos na osteogênese e suas funções básicas.

Citocina	Função
RUNX2	Atua no processo de diferenciação de mesenquimal para osteoblastos.
M-CSF	Atua na unidade formadora de colônias granulócito-monócito (CFU-GM) para diferenciação em osteoclastos.
RANKL	Atua nos osteoclastos e células precursoras de osteoclastos (OCP).
Osteocalcina	Diferencia osteoblastos em matriz mineralizada.

Paralelo à atuação desses marcadores, encontra-se a atividade da fosfatase alcalina, também influente sobre o processo de osteogênese. Essa enzima é encontrada em grande parte dos tecidos do corpo, sendo os principais o fígado, os rins e os ossos. No tecido ósseo, ela é conhecida como Fosfatase Alcalina Óssea (FAO) específica. É sintetizada pelos osteoblastos, e apresenta como função geral a hidrólise de íons de fosfato em pH alcalino, permitindo o seu fornecimento para o interior das vesículas que o secretam (11). Dessa forma, vale ressaltar a importância dos fatores bioquímicos para o processo de osteogênese. Isto porque eles influenciam na diferenciação dos tipos celulares encontrados no tecido, e assim, permitem uma representação fiel da fisiologia normal.

1.2. Abordagens tecnológicas para o crescimento ósseo.

Os tratamentos disponíveis para danos e lesões do tecido ósseo representam um custo muito elevado para saúde pública, sendo que somente nos Estados Unidos são gastos aproximadamente 793 milhões de dólares por ano para este fim (2). Grande parte das abordagens médicas envolvem a utilização de enxertos autólogos (do próprio paciente)

ou heterólogos (de outro indivíduo da mesma espécie), que geram diferentes limitações de aplicabilidade, tais como a morbidade do doador, o procedimento de coleta, a possibilidade de rejeição e o suprimento restrito do material coletado (2). Dessa forma, é de extrema relevância o desenvolvimento de outras opções de tratamento, visando à reparação do dano com diminuição de riscos para o paciente. Entre as opções, encontra-se a engenharia de tecidos que é uma ciência multidisciplinar, que visa regenerar órgãos e tecidos que perderam suas funções total ou parcialmente, utilizando três componentes básicos: as células, um suporte poroso para o crescimento celular, e estímulos físicos e bioquímicos, com intuito de estimular as características desses tecidos e órgãos e suas condições fisiológicas normais (13).

Dentre as abordagens utilizadas para aplicação em engenharia de tecidos, a biofabricação é uma das mais básicas e conhecidas. A biofabricação utiliza suportes (*scaffolds*), visando sustentar o crescimento celular, de modo a não gerar nenhum defeito sistêmico (interações com demais tecidos e órgãos ocorrendo de forma patológica ou prejudicial) ou local (ação direta na região de aplicação) indesejados, e devem apresentar comportamentos biológicos semelhantes ao do órgão ou tecido que está sendo substituído (14). Essa abordagem com *scaffolds* (traduzida na língua portuguesa, como arcabouço), consiste no processamento de estruturas tridimensionais porosas (Figura 2) utilizando substâncias únicas ou combinadas denominadas de biomateriais, podendo ser de origem natural ou sintética (13).

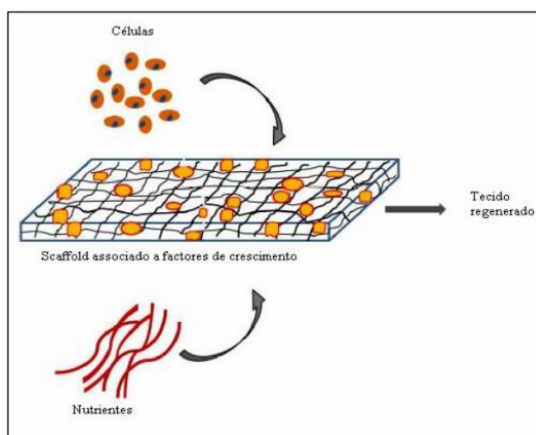


Figura 2: Representação dos componentes de engenharia de tecidos (3).

Esses biomateriais podem ser processados por técnicas de biofabricação, que resulta na produção do arcabouço de sustentação. Em relação às abordagens disponíveis que são utilizadas para isso, diversos trabalhos foram propostos, visando à melhoria das técnicas e a ampliação do conhecimento nessa área.

A segunda abordagem empregada é denominada de *scaffold-free*, e tem como objetivo a mimetização do tecido, através da utilização de hidrogéis como meio de suporte celular. Nessa abordagem, o hidrogel deve se assemelhar com a matriz extracelular, para garantir um ambiente adequado de proliferação e diferenciação celular. A grande vantagem é a possibilidade de se desenvolver um material já associado com células e/ou fatores de crescimento para serem administrados no local a ser reparado. Proporcionando, desta forma, um ambiente mais bioativo e auxiliando na integração do tecido com o hospedeiro (3). Resultado este que difere da abordagem *scaffold-based*, que apresenta uma viabilidade celular menor, em decorrência da maior dificuldade de difusão dos nutrientes e do controle das propriedades físicas e mecânicas nos

arcabouços de sustentação (2). Existem estudos a respeito da abordagem *scaffold-free* ser aplicada na reconstrução de diferentes tecidos e órgãos, como a pele, vasos sanguíneos, nervos, tecido cardíaco, bexiga, traqueia e osso (15). Estas duas abordagens são explicadas resumidamente a seguir, e suas diferentes metodologias estão apresentadas na tabela 1.

Tabela 2: Revisão bibliográfica de estudos em biofabricação, simulação computacional e medicina regenerativa.

Objetivos.	Metodologia.	Resultados.	Referência.
Estudar os efeitos de nanofibras reticuladas por meio de vapores de glutaraldeído pelo processo de eletrofiação, visando à entrega prolongada de drogas.	O modelo foi caracterizado por meio de simulações <i>in silico</i> de mecânica molecular.	A reticulação causou a liberação dos medicamentos; As propriedades de tração aumentaram; Quanto maior a quantidade de agente de reticulação, menos porosa a fibra.	(16)
Incorporar acrílico - PEG – colágeno em hidrogéis de cantiléveres no SLA; Verificar como as rigidezes afetam a contratilidade dos cardiomiócitos.	Utilização da tecnologia estereolitográfica 3D polimerizável por UV para fabricação dos cantiléveres.	A incorporação de acrílico – PEG – colágeno em materiais à base de PEGDA melhorou a adesão, disseminação e organização celular.	(17)
Desenvolver um método de tecido autoportante e perfundido (SSuPer) baseado em osteoblastos e livre de scaffolds.	Construção de um modelo CFD do tecido, integrado ao biorreator FABRICA; A análise das características desse tecido.	O tecido replicou a vascularização e a perfusão observada <i>in situ</i> .	(18)
Realizar experimentos numéricos para simular a fusão e classificação de células durante o processo de biofabricação de redes vasculares.	Foi desenvolvido um modelo de rede multicelular, através de experimentos numéricos, pelo algoritmo cinético Monte Carlo (KMC), com base na Lei de Arrhenius.	Demonstrou a viabilidade de fabricar as estruturas vasculares por meio da tecnologia de bioimpressão.	(19)
Generalizar o formalismo CPD com objetivo de incluir partículas de biotintas não idênticas, frequentemente usadas em aplicações de	Realização da fusão de dois agregados esféricos desiguais seguindo as etapas de modelagem e simulação.	O volume do sistema foi conservado nas simulações CPD; Durante a fusão, quase não houve a mistura entre as células de diferentes agregados.	(20)

bioimpressão.			
Demonstrar como as ferramentas de simulação CFD, IPS e IBOFlow podem ser usadas para prever o processo de impressão de hidrogéis usados para biotintas.	Foi utilizada uma ferramenta de simulação de dinâmica de fluidos e as análises foram feitas com base nos dados de oscilação das biotintas, utilizando um modelo reológico.	As ferramentas de simulação podem ser utilizadas para isolar parâmetros como velocidade de impressão, altura do bico, taxa de fluxo e o caminho de impressão.	(21)
Avaliar a manipulação acústica e o modo de vibração de células biológicas durante a bioimpressão baseada em extrusão.	Foi realizada a predição numérica da frequência de vibração estrutural de um bico cilíndrico cheio de células biológicas.	As células acumuladas ao longo da impressão mostraram potencializar o alongamento e a diferenciação celular.	(22)
Analisar a cinética de reticulação para a gelificação química de hidrogéis de alginato de sódio através da difusão de cloreto de cálcio.	Foram realizadas medições experimentais do volume absorvido de cloreto de cálcio no hidrogel em tempos diferentes;	O ambiente mecânico experimentado por células, e o seu estímulo variaram com o estado do gel;	(23)
Apresentar um conceito de bioimpressão 3D que usa células tronco como modelo de construção.	Foi desenvolvida uma configuração de impressão que consiste em um sistema de extrusão a base de seringa acoplada a um microscópio com estágio controlado manualmente.	Foi possível produzir tecidos com alta fisiologia, assemelhando-se ao fenótipo e as funcionalidades encontradas <i>in vivo</i> .	(24)

1.3. Análise *in silico* do processo de osteogênese.

A literatura descreve o desenvolvimento osteogênico envolvendo diversos fatores, dentre eles os genéticos e funcionais. Neste sentido, diversos trabalhos vêm sendo elaborados ao longo dos anos, com intuito de prever condições que influenciam neste processo. No estudo de Lipphaus, a teoria foi associada à simulação de elementos finitos, visando validar a hipótese de que a estrutura dos ossos longos pode ser explicada à ausência de tensão de flexão. Para isso, foi simulado a estrutura de um osso longo, com a definição das cargas de compressão e torção estabelecidas a partir de um modelo de cartilagem (25). Gomez e colaboradores, implementaram um modelo de

elementos finitos, para ossificação intramembranosa, com intuito de descrever o desenvolvimento osteogênico em locais de extração dentária. A validação foi realizada a partir de um experimento animal (*in vivo*), em cães (26). O projeto de Xue, por sua vez, apresentou um sistema de cultura osteocondral, por meio de um modelo de elementos finitos, baseado em imagens de tomografia. O objetivo foi estudar os *scaffolds*, biorreatores, e a influência da metodologia CAD (*Computer Aided Design*) para engenharia de tecidos osteocondral. Os resultados *in vitro* demonstraram que o sistema de co-cultura apoiou o crescimento tecidual, tratando-se de viabilidade celular, proliferação e distribuição. Os resultados *in silico* mostraram diferenças significativas entre as duas abordagens, principalmente associado com a velocidade de fluxo, mistura de meios de diferenciação no biorreator, e tensão de cisalhamento induzida por fluido (27).

De modo geral, esses modelos permitem compreender os fundamentos da biologia celular, tecidual, comportamentos bioquímicos, físicos, e mecânicos relacionados com o processo de formação óssea. Além disso, pode contribuir para a redução de custos em etapas laboratoriais, e auxiliar no diagnóstico e prognóstico de patologias ósseas (26).

2. Objetivo.

O objetivo deste trabalho é prever um ambiente adequado para a diferenciação das células ósseas, realizando análises *in silico* do processo de osteogênese, com a verificação da influência dos marcadores que promovem esse desenvolvimento celular.

3. Metodologia.

O *software CompuCell3D* foi utilizado para desenvolvimento das simulações. Este permite a resolução de problemas de alta biocomplexidade, integrando modelos matemáticos específicos que auxiliam na compreensão do desenvolvimento de reações químicas e enzimáticas, presentes nos tecidos biológicos, garantindo os melhores padrões celulares e de matriz possíveis. Assim, a matriz extracelular irá apresentar sua função de suporte bioquímico e estrutural normal, por meio da sua composição constituída por macromoléculas, e que são secretadas por células adjacentes.

A visualização do código é realizada em três arquivos distintos, que são acoplados para gerar a simulação, sendo eles: o arquivo *xml*, o *.py* e o *steppables* (28).

No arquivo *xml* são especificados os parâmetros gerais da simulação, como os tipos celulares e suas atuações (29). Além da definição de *Plugins* que irão calcular um único termo de função de energia, ou irão monitorar a rede para as mudanças durante a simulação (por exemplo, volume celular, contato entre as células, quimiotaxia, secreção, elasticidade e conectividade).

```
<Plugin Name="CellType">
  <!-- Listing all cell types in the simulation -->
  <CellType TypeId="0" TypeName="Medium"/>
  <CellType TypeId="1" TypeName="Mesenchymal"/>
  <CellType TypeId="2" TypeName="Osteoblast"/>
  <CellType TypeId="3" TypeName="Osteocyte"/>
  <CellType TypeId="4" TypeName="Matrix" Freeze=""/>
  <CellType TypeId="5" TypeName="CFUGM"/>
  <CellType TypeId="6" TypeName="OCP"/>
  <CellType TypeId="7" TypeName="Osteoclast"/>
  <CellType TypeId="8" TypeName="Wall" Freeze=""/>
</Plugin>
```

Figura 3: Demonstração do arquivo *xml* com as células presentes na simulação.

Os *steppables* são arquivos *python*, executados repetidamente após intervalos definidos de etapas de *Monte Carlo Simulation* (MCS), ou uma vez no início ou no final da simulação (11). A abordagem de *Monte Carlo Simulation* (MCS) calcula a probabilidade de diferentes resultados de acordo com uma grande quantidade de variáveis, com o objetivo de medir a confiabilidade dos resultados da análise (28). No arquivo *steppables* são definidos os cálculos e propriedades específicas de cada marcador, podendo-se manipular as propriedades celulares. Neste caso, o arquivo *steppables* contém as configurações e cálculos de motilidade e diferenciação associados a cada marcador específico. Além disso, conta com a definição das funções para a plotagem dos gráficos na simulação, de modo que são descritos o título, estilo, cor e tamanho. A figura 5 demonstra um exemplo no código, onde as células OCP (tipo 6), são diferenciadas em Osteoclastos (tipo 7) pela ação da RANKL.

```
field5=CompuCell.getConcentrationField(self.simulator,"RANKL")
pt5 = CompuCell.Point3D()
list = []

for cell in self.cellList:
    pt5.x=int(cell.xCOM)
    pt5.y=int(cell.yCOM)
    pt5.z=int(cell.zCOM)
    concentrationAtCOM5=field5.get(pt5)
    list.append(concentrationAtCOM5)

    if cell.type == 6:
        # Concentração de RANKL induz diferenciação para tipo 6 - de OCP para Osteoclasto
        if concentrationAtCOM5 >= 5.5 and cell.id % 3 == 0:
            cell.type = 7

        if concentrationAtCOM5 >= 6.5 and cell.id % 2 == 0:
            cell.type = 7

print("Concentração Máxima de RANKL:", round(max(list),2))
```

Figura 4: Demonstração do arquivo *steppables* relacionado à secreção e difusão do marcador RANKL.

O arquivo *.py* apresenta informações ao próprio *CompuCell3D*, a respeito das diversas unidades de *stepps* que foram criadas nos outros arquivos.


```
from cc3d import CompuCellSetup
...
from OsteogeneseSteppables import *
CompuCellSetup.register_steppable(steppable=MotilitySteppable(frequency=1))
CompuCellSetup.register_steppable(steppable=PlotGraphics(frequency=1))
...
CompuCellSetup.run()
```

Figura 5: Demonstração do arquivo .py.

4. Resultados e Discussão.

Ao rodar a simulação do *CompuCell3D*, é possível identificar principalmente a presença de células-tronco mesenquimais e CFU-GM nos primeiros MCS, isto porque elas estão envolvidas no processo inicial da osteogênese. Além disso, o modelo conta com as etapas de diferenciação das demais células presentes, o que permite a visualização de cada estágio do desenvolvimento ósseo. Assim ocorre também com as citocinas, de tal modo que cada uma delas deve ser alterada no código para que possa agir no momento adequado e sobre as células em que usualmente atuam, representando o que ocorre na fisiologia óssea normal.

a) Diferenciação e proliferação celular.

A etapa de diferenciação é importante para que todas as células presentes no desenvolvimento ósseo normal possam ser formadas. Inicialmente a simulação apresentou o desenvolvimento de um único aglomerado, entretanto, para a formação tecidual é necessária a fusão entre diversos esferoides, e isso foi simulado junto com a etapa de diferenciação. Dessa forma, dois agregados celulares foram dispostos e, a partir de cada MCS, eles passaram a se unir em um único esferoide, já com a presença de todas as células.

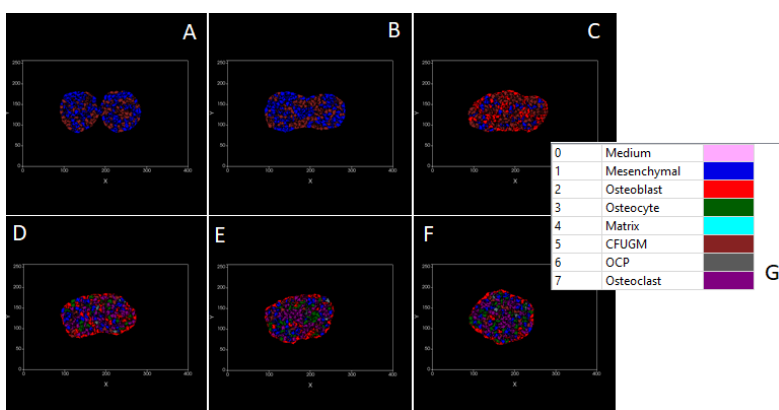


Figura 6: Demonstração da união dos esferoides e diferenciação celular, onde: Em A é possível identificar dois agregados celulares distintos no MCS = 100; Em B pode-se observar o início do processo de união desses esferoides no MCS = 900; Em C os esferoides já se fundiram e as células estão se diferenciando no MCS = 2100; Em D (MCS = 2900), E (MCS = 5100) e F (MCS = 10000) todas as células passam a aparecer na simulação. Em G está representado a legenda das cores e células correspondentes.

b) Análise dos principais marcadores bioquímicos da osteogênese.

A atividade de RUNX2 se mostra bastante intensa desde o início da união dos esferoides, e isso se deve ao fato dela estar associada com a diferenciação de mesenquimal para osteoblastos, sendo essa uma das primeiras etapas do processo de osteogênese.

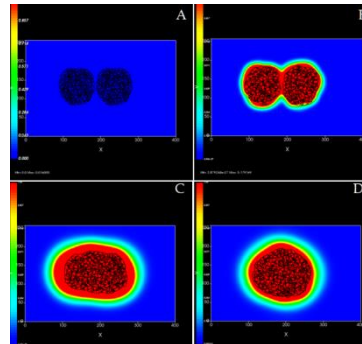


Figura 7: Atividade da RUNX2, onde em A demonstra a presença de dois esferoides iniciais, sem a atuação do marcador em MCS = 0; A partir de B (MCS = 500) a RUNX2 já está em intensa atividade, e permanece assim ao longo da simulação; Em C os esferoides estão se unindo em MCS = 5000; Em D o agregado celular está completo, com a citocina ainda ativa (MCS = 9500).

O M-CSF atua tanto na fase inicial da diferenciação, agindo sob as células osteoprogenitoras, como nas fases posteriores através do auxílio para formação de osteoclastos, responsáveis pela reabsorção de osso danificado.

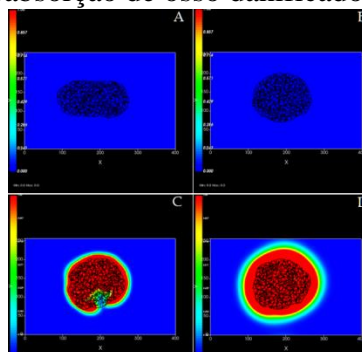


Figura 8: Atividade do M-CSF, onde em A (MCS = 2000) e em B (MCS = 7000) ela não está ativa; Em C (MCS = 7500) a citocina passa a atuar, juntamente com a diferenciação celular; Em D (MCS = 9500) sua atividade está intensa.

A atividade de osteocalcina nos primeiros MCS é zerada, e isto ocorre pelo fato da mesma atuar em células já diferenciadas (osteoclastos), para mineralização da matriz. Ao longo da simulação e com o desenvolvimento celular, a osteocalcina passa a agir, como demonstra as imagens:

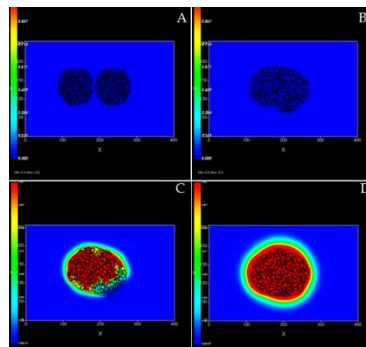


Figura 9: Atividade da osteocalcina, onde em A observa-se os dois esferoides iniciais, sem a atuação da citocina, em $MCS = 0$; Em B os esferoides já estão unidos e o processo de diferenciação celular já está acontecendo, porém a osteocalcina ainda permanece inativa, no $MCS = 7000$; Em C a osteocalcina começa a atuar no modelo em concentrações moderadas, no $MCS = 7500$; Em E a atividade da citocina está alta em $MCS = 9500$.

A RANKL está associada com a diferenciação dos osteoblastos em células osteoprogenitoras e osteoclastos, que irão atuar no desenvolvimento da matriz e conseqüentemente na formação do tecido ósseo. Dessa forma, é uma citocina presente durante grande parte do processo de osteogênese, desde o início da diferenciação celular.

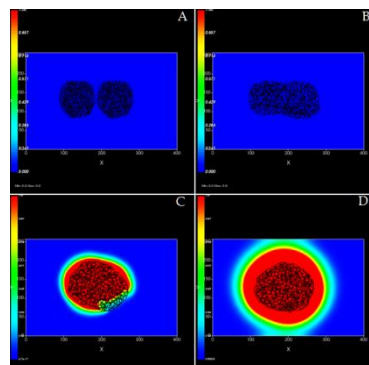


Figura 10: Atividade da RANKL, onde em A ($MCS = 0$) e em B ($MCS = 3000$), demonstram a união dos esferoides, sem a atuação da citocina; Em C ($MCS = 7500$) a RANKL passa a atuar e em D ($MCS = 9500$) sua atividade está intensa.

A fosfatase alcalina está associada com a mineralização da matriz, através da deposição de íons de cálcio e fosfato. Dessa forma, sua atividade deve permanecer aumentada ao longo do processo de diferenciação.

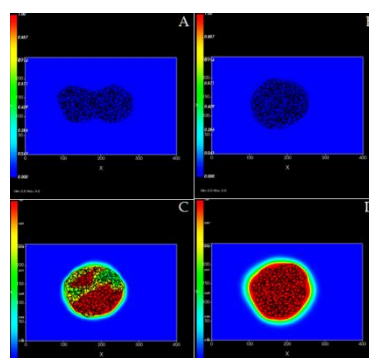


Figura 11: Atividade da fosfatase alcalina, onde em A (MCS = 500) e em B (MCS = 7000) demonstram a união dos esferoides, sem a presença da enzima ativa; Em C (MCS = 7500) a fosfatase começa a aparecer e em D (MCS = 9000) ela está muito ativa.

c) Validação dos valores dos tipos celulares presentes no código.

A porcentagem de cada célula que atua no processo de desenvolvimento do tecido ósseo encontrada *in vivo*, pode ser descrita na seguinte distribuição:

Tabela 3: Porcentagem referente a cada tipo celular (30).

Célula	Porcentagem no tecido ósseo
Unidade Formadora de Colônia Granulócito / Macrófago (CFUGM)	0.5%
Célula Precursora de Osteoclasto (OCP)	0,5%
Mesenquimal (MSCs)	1%
Osteoclasto	1%
Osteoblasto	4–6%
Osteócito	90-95%

Visando atingir tais representações, foi realizada uma análise por regressão não linear, em relação à atuação de cada citocina, que irá auxiliar na diferenciação e consequentemente, na quantidade de cada célula da simulação. Em estatística, uma regressão não linear representa uma forma de análise, onde os dados são gerados a partir de uma função, de modo que depende de uma ou mais variáveis independentes. Essas funções, nestes casos, não possuem linearidade, o que faz com que a análise necessite de técnicas de aproximações de valores (31). Baseado nos manuais disponibilizados pela plataforma do CompuCell 3D, a equação de referência utilizada para as análises conta com um valor de concentração (C), a constante de difusão (D), a constante de decaimento (K) e a velocidade (V).

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D\nabla^2 c + kc + \vec{v} \cdot \vec{\nabla} c + \text{secretion}$$

Figura 12: Equação utilizada pelo *software* para as análises.

A partir desses dados, o CompuCell 3D permite a edição no código dos valores de cada citocina, para posterior análise no Excel e Ansys. Foram utilizados três valores distintos, para comparação e verificação dos melhores resultados. A citocina RUNX2 foi a primeira a ser observada no código, visto que auxilia na diferenciação das células mesenquimais, para os osteoblastos. A partir dos gráficos gerados pelo Excel, o valor que melhor representa os 90-95% de células diferenciadas em osteoblastos foi uma concentração de 0.2 na constante de difusão, e 0.003 na constante de decaimento.

```
<DiffusionField Name="RUNX2">
  <DiffusionData>
    <FieldName>RUNX2</FieldName>
    <InitialConcentrationExpression>0.0</InitialConcentrationExpression>
    <GlobalDiffusionConstant>0.2</GlobalDiffusionConstant>
    <GlobalDecayConstant>0.003</GlobalDecayConstant>
    <DecayCoefficient CellType="Osteoblast">0.002</DecayCoefficient>
    <DiffusionCoefficient CellType="Mesenchymal">0.01</DiffusionCoefficient> -->
  </DiffusionData>
  <SecretionData>
    <Secretion Type="Mesenchymal">0.27</Secretion>
  </SecretionData>
  <BoundaryConditions>
    <Plane Axis="X">
      <Periodic/>
    </Plane>
    <Plane Axis="Y">
      <Periodic/>
    </Plane>
  </BoundaryConditions>
</DiffusionField>
```

Figura 13: Valores estipulados de RUNX2 na simulação.

Como demonstrado nos gráficos abaixo, dentre os três valores testados na taxa de decaimento, para a RUNX2, o que mais se comportou como ocorre fisiologicamente, foi o valor de 0.003. Foi demonstrado que a simulação atingiu aproximadamente 92% de osteoblastos diferenciados, representado pelo eixo y. Em “A” consta o gráfico quando aplicado uma constante de 0.001, resultando em um valor reduzido na concentração celular de osteoblastos; em “B” a constante de decaimento é de 0.002, e representa um aumento de aproximadamente 3x em relação à “A”, porém ainda sem atingir o valor encontrado *in vivo*; e “C” é o resultado da constante de decaimento em 0.003, gerando uma quantidade significativa de osteoblastos diferenciados.

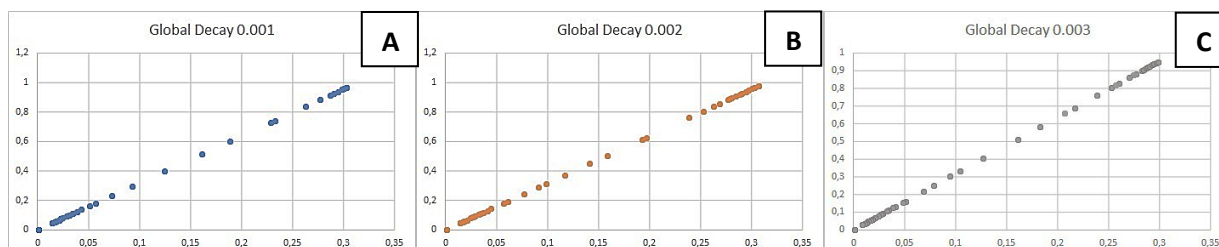


Figura 14: Representação dos valores adquiridos a partir de cada variação na taxa de decaimento da simulação de RUNX2. O eixo x representa a constante de decaimento, e o eixo y a concentração de osteoblastos.

5. Conclusão.

As etapas de proliferação e diferenciação foram simuladas de forma adequada a partir do *software* CompuCell 3D, sendo possível relacionar esses processos com o que ocorre na fisiologia óssea normal. De acordo com as análises, os diversos marcadores que atuam durante a simulação implicam no aumento ou diminuição da quantidade de cada tipo celular, permitindo a sua atuação no desenvolvimento do tecido.

Estes marcadores apresentados estão diretamente relacionados com o desenvolvimento ósseo, sendo que a osteocalcina, o RANKL, o M-CSF e a enzima fosfatase alcalina apresentam comportamentos similares em relação ao modelo atual *in silico*. Essas não apresentam atividade no início da simulação, e somente passam a agir após a união dos esferoides e a diferenciação celular, de modo que possam atuar nas células específicas. O fator de transcrição RUNX2 apresenta um comportamento variado, de modo que age

no modelo em etapas mais iniciais, por estar associada com o processo de diferenciação de mesenquimal para osteoblastos.

A utilização de um modelo computacional enriquece os estudos no âmbito da engenharia tecidual, isto porque permite uma análise qualitativa do ambiente de desenvolvimento celular e dos marcadores associados a cada etapa do processo.

6. Trabalho Futuro.

Visando a melhor exploração, em trabalhos futuros, desses marcadores com intuito de prever um ambiente de desenvolvimento tecidual adequado, deve-se avaliar as taxas de atuação e decaimento de cada substância bioquímica, bem como criar curvas em relação ao tempo e concentração de cada uma, ao longo de cada MCS, o que permitirá a compreensão ainda maior de cada marcador.

7. Referências Bibliográficas.

1. Acidentes de trânsito no Brasil, um problema de saúde pública. *Jornal da USP*. 2018.
2. Kronemberger GS. Gabriela soares kronemberger produção de esferoides a partir de células-tronco/estromais de tecido adiposo humano para fabricação de tecido ósseo in vitro. Programa pós Grad em Biomed Translacional - Univ do Gd Rio, Duque Caxias. 2018;128.
3. Moreno MSM da S. Engenharia de Tecidos na substituição de tecido ósseo. *Clim Chang 2013 - Phys Sci Basis [Internet]*. 2014;1–30. Available from: https://www.cambridge.org/core/product/identifier/CBO9781107415324A009/type/book_part
4. Tortora GJ. *Corpo Humano: Fundamentos de Anatomia e Fisiologia*. Vol. 18, *Clinical Journal Of Pain*. 2003.
5. Infante A, Rodríguez CI. Osteogenesis and aging: lessons from mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther*. 2018;9(1):244.
6. Judas F, Palma P, Falacho R, Figueiredo H. Estrutura E Dinâmica Do Tecido Ósseo. *Cerâmica*. 2012;51.
7. Komori T. Molecular Mechanism of Runx2-Dependent Bone Development. *Mol Cells*. 2020;43(2):168–75.
8. Yokota K. Inflammation and osteoclasts. *Japanese J Clin Immunol*. 2017;40(5):367–76.
9. Sobacchi C, Menale C, Villa A. The RANKL-RANK axis: A bone to thymus round trip. *Front Immunol*. 2019;10(MAR):1–10.
10. Zanatta LCB, Boguszewski CL, Borba VZC, Kulak CAM. Osteocalcin, energy and glucose metabolism. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2014;58(5):444–51.
11. Andia DC, Cerri PS, Spolidorio LC. Tecido ósseo: aspectos morfológicos e histofisiológicos. *Rev Odontol da UNESP*. 2006;35(2):191–8.
12. Roudsari JM, Mahjoub S. Quantification and comparison of bone-specific alkaline phosphatase with two methods in normal and paget's specimens. *Casp J Intern Med*. 2012;3(3):478–83.
13. Silva VV. Aplicação de Biomateriais em Ortopedia e Engenharia de Tecido Ósseo. *Rev Saúde e Meio Ambient [Internet]*. 2017;5(2):14–27. Available from: <http://seer.ufms.br/index.php/sameamb/article/view/4151>
14. Pattaro AF. Síntese , caracterização e Processamento de Polímeros

- Biorreabsorvíveis para uso na Engenharia de Tecidos (Tissue Engineering). Tese Doutorado - Univ Estadual Campinas, Fac Eng Química. 2016;291.
15. SICCHIERI LG. Universidade de são paulo faculdade de odontologia de ribeirão preto luciana gonçalves sicchieri engenharia de tecido ósseo: avaliações. *In Vitro*. 2010;
 16. Shaikh RP, Kumar P, Choonara YE, Du Toit LC, Pillay V. Crosslinked electrospun PVA nanofibrous membranes: Elucidation of their physicochemical, physicomechanical and molecular disposition. *Biofabrication*. 2012;4(2).
 17. Chan V, Jeong JH, Bajaj P, Collens M, Saif T, Kong H, et al. Multi-material bio-fabrication of hydrogel cantilevers and actuators with stereolithography. *Lab Chip*. 2012;12(1):88–98.
 18. Segó TJ, Prideaux M, Sterner J, McCarthy BP, Li P, Bonewald LF, et al. Computational fluid dynamic analysis of bioprinted self-supporting perfused tissue models. *Biotechnol Bioeng*. 2020;117(3):798–815.
 19. Sun Y, Yang X, Wang Q. In-silico analysis on biofabricating vascular networks using kinetic Monte Carlo simulations. *Biofabrication*. 2014;6(1).
 20. McCune M, Shafiee A, Forgacs G, Kosztin I. Predictive modeling of post bioprinting structure formation. *Soft Matter*. 2014;10(11):1790–800.
 21. Gohl J, Markstedt K, Mark A, Hakansson K, Gatenholm P, Edelvik F. Simulations of 3D bioprinting: predicting bioprintability of nanofibrillar inks. 2019;0–31.
 22. Sriphutkiat Y, Kasetsirikul S, Ketpun D, Zhou Y. Cell alignment and accumulation using acoustic nozzle for bioprinting. *Sci Rep [Internet]*. 2019;9(1):1–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-019-54330-8>
 23. Hajikhani A, Scocozza F, Conti M, Marino M, Auricchio F, Wriggers P. Experimental characterization and computational modeling of hydrogel cross-linking for bioprinting applications. *Int J Artif Organs*. 2019;42(10):548–57.
 24. Brassard JA, Nikolaev M, Hübscher T, Hofer M, Lutolf MP. Recapitulating macro-scale tissue self-organization through organoid bioprinting. *Nat Mater*. 2021;20(1):22–9.
 25. Lipphaus A, Witzel U. Biomechanical Study of the Development of Long Bones: Finite Element Structure Synthesis of the Human Second Proximal Phalanx Under Growth Conditions. *Anat Rec*. 2019;302(8):1389–98.
 26. Corredor-Gómez JP, Rueda-Ramírez AM, Gamboa-Márquez MA, Torres-Rodríguez C, Cortés-Rodríguez CJ. An intramembranous ossification model for the in silico analysis of bone tissue formation in tooth extraction sites. *J Theor Biol [Internet]*. 2016;401:64–77. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtbi.2016.04.023>
 27. Xue R, Chung B, Tamaddon M, Carr J, Liu C, Cartmell SH. Osteochondral tissue coculture: An in vitro and in silico approach. *Biotechnol Bioeng [Internet]*. 2019;116(11):3112–23. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/bit.27127>
 28. Swat MHJB. CompuCell3D Reference Manual Version 3.7.2 Maciej H. Swat, Julio Belmonte, Randy W. Heiland, Benjamin L. Zaitlen, James A. Glazier, Abbas Shirinifard. 2020;(January).
 29. Jiang S-H, Li D-Q, Cao Z-J, Zhou C-B, Phoon K-K. Efficient System Reliability Analysis of Slope Stability in Spatially Variable Soils Using Monte Carlo Simulation. *J Geotech Geoenvironmental Eng*. 2015;141(2):04014096.
 30. Silva RF, Sasso GR da S, Cerri ES, Simões MJ, Cerri PS. Biology of Bone

- Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *Biomed Res Int.* 2015;2015.
31. Guo M, Hesthaven JS. Reduced order modeling for nonlinear structural analysis using Gaussian process regression. *Comput Methods Appl Mech Eng* [Internet]. 2018;341:807–26. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cma.2018.07.017>