

## **Estudo *in silico* da influência de biofatores no desenvolvimento osteogênico em ambiente *scaffold-free***

**Bolsista Bruna Maria Manzini (CTI) [bruna.manzini@cti.gov.br](mailto:bruna.manzini@cti.gov.br); Bianca C. dos Santos (CTI) [bsantos@cti.gov.br](mailto:bsantos@cti.gov.br); Júlia G. Blahun (CTI) [julia.gandini@cti.gov.br](mailto:julia.gandini@cti.gov.br); Pedro Y. Noritomi (CTI) [pedro.noritomi@cti.gov.br](mailto:pedro.noritomi@cti.gov.br).**

### **Resumo**

*Acidentes, ressecção tumoral, entre outros, podem degenerar o osso, elevando os custos do Sistema Único de Saúde. Apesar da capacidade de autorreparo, o tecido ósseo apresenta limitações frente a um dano complexo. Atualmente, os tratamentos são invasivos, aumentando a morbi-mortalidade, demonstrando que novas terapias precisam ser desenvolvidas. A engenharia de tecidos (ET) *scaffold-free* pode ser eficaz, viabilizando a realização de um único procedimento para implante e proporcionando um microambiente mais bioativo para as células. Atualmente, é possível analisar o comportamento celular por meio de modelos computacionais, unindo conhecimentos em Bioengenharia, Tecnologia da Informação e Biologia de Células-tronco. Sendo assim, este trabalho objetiva analisar *in silico* a interferência de fatores bioquímicos no desenvolvimento de tecido ósseo em esferoides. O software CompuCell3D foi utilizado para simular a agregação celular, fusão dos esferoides e diferenciação osteogênica. As células foram modeladas como células-tronco mesenquimais e unidade de colônia- Granulócito/ Monócito e a simulação demonstra a formação e fusão dos esferoides. Posteriormente, ocorre a diferenciação celular para diferentes fenótipos relacionados ao tecido ósseo, em resposta à secreção de fatores bioquímicos presentes no biomodelo. Desta forma, é possível fazer uma conexão entre os modelos fisiológicos e o virtual correspondente, em benefício da medicina.*

*Palavras-chave: Bioengenharia, Osteogênese, Engenharia de tecidos.*

### **1. Introdução**

O corpo humano apresenta mais de 200 ossos que desempenham diversas funções, como estrutural e de proteção aos órgãos vitais. Este tecido dinâmico também suporta o movimento e a locomoção corporais (SU et al., 2018), além de produzir células sanguíneas e também armazenar minerais e fatores de crescimento (FCs). A presença de células-tronco responsáveis pela secreção de FCs e citocinas está profundamente relacionada com suas funções fisiológicas, e também o processo de remodelação contínua mantém a integridade do sistema esquelético ósseo, promovendo a manutenção anatômica, fisiológica e funcional deste tecido (ROSETI et al., 2017).

No entanto, acidentes, ressecção tumoral, doenças congênitas, entre outras, podem degenerar o osso, gerando custos elevados para o Sistema Único de Saúde. O tecido ósseo é capaz de reparar a maioria das fraturas, porém, quando o dano é complexo, muitas vezes justifica a escolha clínica por tratamentos invasivos (ROSETI et al., 2017; WU; ZHAO, 2019). Os defeitos “críticos”, como esses danos são chamados, possuem no mínimo 2 cm de diâmetro, sendo que a falha no reparo costuma variar entre 10 a 50% dos casos e não podem se auto-regenerar.

Consequentemente, o tecido sofrerá com a supressão sanguínea, resultando em osteonecrose e perda óssea.

Atualmente, as opções de tratamentos envolvem o transplante de matriz mineralizada xenóloga e heteróloga, além da colocação de enxertos ósseos autólogos. Em algumas situações, a terapia pode envolver o uso de implantes feitos com biomateriais, como polímeros, metais e cerâmicas. No entanto, essas abordagens podem ser insuficientes e envolver múltiplos procedimentos ablativos, elevando a morbi-mortalidade associada a esses casos clínicos (AGARWAL; GARCÍA, 2015). Sendo assim, novas possibilidades terapêuticas eficazes precisam ser desenvolvidas (GRAYSON et al., 2016).

Neste aspecto, a engenharia de tecidos pode ser um caminho adequado, pois objetiva restaurar e reparar o tecido danificado. Esta área interdisciplinar, baseada nos princípios das ciências da vida e da engenharia, viabiliza a realização de um único procedimento para implante e avançou consideravelmente no desenvolvimento de materiais que mimetizam o tecido e as suas condições fisiológicas normais, usando a tríade clássica: a combinação de células, estímulos sinalizadores e biomateriais para suportar o crescimento celular (ROSETI et al., 2017; ZHAO et al., 2020).

Os *scaffolds* são dispositivos que sustentam as células durante o processo de desenvolvimento do tecido, fornecendo a arquitetura adequada relacionada com o tecido (ALBLAWI et al., 2020). Os métodos de engenharia de tecidos que se baseiam na utilização de *scaffolds* empregam biomateriais que conferem resistência mecânica ao tecido, além de elasticidade. Eles devem ser porosos e apresentar propriedades como biocompatibilidade e biodegradação, que permite serem gradualmente substituídos pelo tecido à medida que as células crescem em sua superfície. No entanto, a utilização desta abordagem não é livre de desvantagens como o desenvolvimento de resposta imunológica e de toxicidade relacionada ao biomaterial escolhido (ALBLAWI et al., 2020).

No intuito de solucionar estes desafios, a abordagem de engenharia de tecidos sem *scaffold* surgiu, oferecendo um ambiente de alta densidade, que se assemelha às características da matriz extracelular do tecido a ser recuperado, que aliado às células e aos fatores sinalizadores, promove uma maior interação com o tecido hospedeiro. Soma-se a isso, a diminuição da chance de reações inflamatórias e toxicidade relacionada ao biomaterial, desta forma possibilitando a proliferação celular e a manutenção da sua viabilidade no local. Além disso, o progresso da tecnologia de manufatura aditiva e de cultivo celular tridimensional (3D) beneficiaram a difusão desta abordagem também conhecida como *scaffold-free* (DHAWAN et al., 2019).

O aprimoramento das técnicas de cultivo celular 3D de forma a favorecer a comunicação intercelular e célula- matriz extracelular, possibilitou superar algumas dificuldades encontradas no cultivo celular 2D. Os agregados celulares 3D, também conhecidos como esferoides, podem apresentar maior tolerância à níveis de hipóxia, reduzir a taxa de apoptose, além de secretar mais fatores de crescimento quando comparados ao cultivo celular 2D. Ademais, os esferoides mimetizam a organização e arquitetura do tecido nativo, proporcionando um microambiente bioativo adequado (DORST et al., 2014).

Os esferoides podem ser formados por um único fenótipo celular ou múltiplos (DORST et al., 2014), sendo que a utilização de células-tronco para formação destes agregados é bastante promissora em engenharia de tecidos. Especialmente, as células-tronco mesenquimais estromais (MSCs) vêm sendo amplamente utilizadas, pois são células multipotentes e apresentam alta capacidade de diferenciação na linhagem mesodérmica (osteogênica, condrogênica e adipogênica). Além disso, elas não apresentam fatores de histocompatibilidade

e secretam uma grande variedade de moléculas imunomodulatórias, modulando a resposta imune do hospedeiro (MANZINI et al., 2015).

Atualmente, é possível elucidar o comportamento destas células por meio de modelos biológicos computacionais, que permitem analisar diversos parâmetros (SEGO et al., 2017). A biologia computacional associa os conhecimentos em Bioengenharia, Tecnologia da Informação e Biologia de Células-tronco, ampliando as possibilidades de oferecer alternativas efetivas na área médica. Um modelo *in silico* do comportamento coletivo de estruturas celulares é gerado, permitindo modelar fenômenos como migração celular, agrupamento e crescimento, levando em consideração as forças adesivas, a detecção de ambiente e as restrições de volume e área de superfície. Neste contexto é possível modelar células, como também partes individuais de uma célula ou até mesmo regiões de fluidos (SEGO et al., 2017). Desta forma, a bioengenharia é uma abordagem promissora, que apresenta o potencial para beneficiar a sociedade e a medicina.

Sendo assim, o objetivo principal do presente trabalho é desenvolver um biomodelo computacional capaz de reproduzir *in silico* o padrão de comportamento das células em esferoides, analisar a interferência de fatores bioquímicos na diferenciação destas células em tecido ósseo, mimetizando condições fisiológicas, visando aplicações futuras em engenharia de tecidos.

## 2. Metodologia

O modelo computacional foi gerado utilizando-se o *software* gratuito e de código aberto CompuCell3D, que é um ambiente tridimensional de solução de problemas de alta complexidade, que integra vários modelos matemáticos, incluindo o modelo celular de Potts (CPM) (SEGO et al., 2017). A simulação nesse *software* é feita usando Monte Carlo Steps (MCs). Essa ferramenta permite a modelagem de reações celulares a campos químicos externos, como secreção ou reabsorção, e respostas como quimiotaxia e outras respostas bioquímicas. Diferentemente de outros *softwares* para modelagem de sistemas biológicos, como o FLAME, TinkerCell e Virtual Cell, o CC3D é focado em modelos multi-escala, não sendo restrito quanto às aplicações.

O código é gerado utilizando a linguagem de programação Python, sendo que o arquivo de simulação do CompuCell3D possui 3 *scripts*:

- XML: apresenta os aspectos iniciais da célula (tamanho do invólucro para simulação, raio, volume inicial, tipos de célula, força de contato entre as células, etc);
- *Steppables*: são classes em Python abrangendo as funções celulares (mitose, diferenciação, etc). É o principal arquivo da simulação e é formado por três unidades fundamentais: *Start*, *Step* e *Finish*;
- Python: este arquivo importa todas as classes *Steppables* do arquivo anterior, de modo a executá-las durante a simulação.

Uma etapa básica no modelo *clusters* foi desenvolvida, simulando a dinâmica celular de formação do tecido partir de unidades celulares, sendo que os tipos de células serão modelados como células de granulócitos-macrófagos (CFU-GM) e células-tronco mesenquimais (MSCs). O código é iniciado com uma malha de 78 células espalhadas, em um invólucro de 100x100x1 m para simulação, sendo uma simulação de 2 dimensões. O modelo captura eventos como o “cell-sorting” e a fusão dos esferoides.

### 3. Resultados e discussões

A simulação do biomodelo começa com MSCs (azul) e unidades formadoras de colônia-macrófago/ granulócito (CFU-GM), que inicialmente, se encontram espalhadas em rede e, gradualmente, se agregam formando um esferoide de co-cultura, devido às forças intermoleculares (Figura 1 A-F), corroborando o descrito na literatura (DORST et al., 2014).

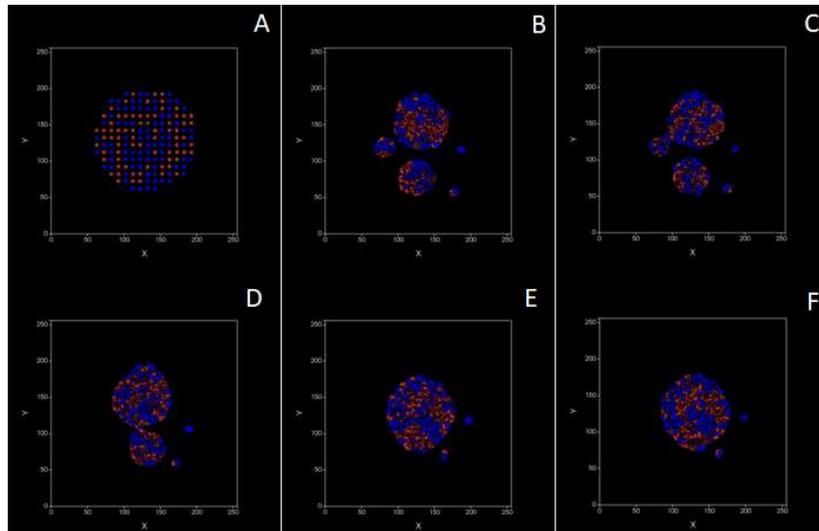


Figura 1: Formação do esferoide de co-cultura, sendo que CFU-GM (cor vinho) e MSCs (azuis). A: MCS = 0; B: MCS = 5860; C: MCS = 5960; D: MCS = 7220; E: MCS = 9580; F: MCS = 9600

Em engenharia de tecidos *scaffold-free*, após o processo de formação do esferoide *in vitro*, o próximo passo envolve a formulação de uma biotinta contendo esferoides, a mesma que é depositada por meio de bioimpressão 3D. Após a impressão, o processo de fusão dos esferoides é uma etapa importante durante a expansão do tecido. Este biomodelo pode demonstrar esta etapa (Figura 2 A- D).

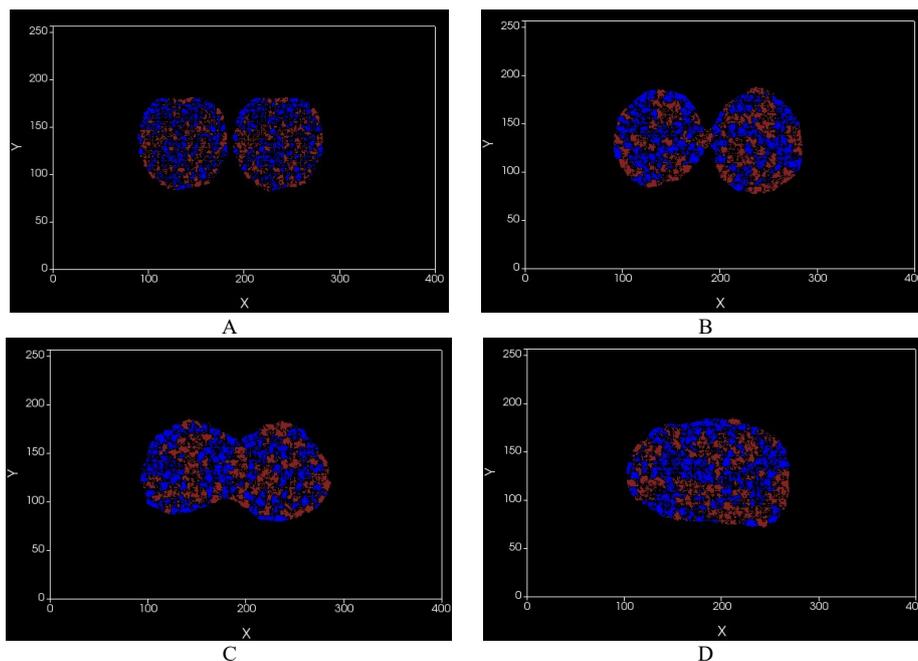


Figura 2: Simulação da fusão dos esferoides co-cultura, sendo CFU-GM na cor vinho, e MSCs em azul. A: MCS = 0; B: MCS = 2000; C: MCS = 2500; D: MCS = 5500

Além disso, as células presentes nos esferoides se diferenciaram para uma diversidade fenotípica, dando origem à osteoblastos, osteócitos, células progenitoras de osteoclastos e osteoclastos (Figura 3 A, B).

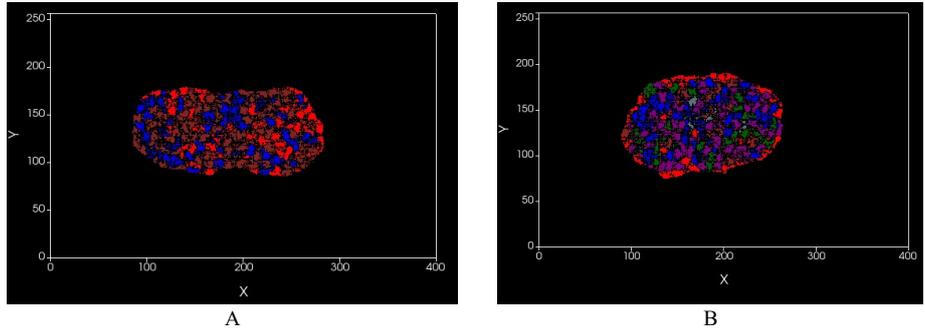


Figura 3: As figuras mostram a simulação da diferenciação das células em osteoblastos (vermelho), osteócitos (verdes), células progenitoras de osteoclastos (roxo) e osteoclastos (cinza). A: MCS = 1100; B: MCS = 4700

Este processo de diferenciação celular foi influenciado pela secreção de citocinas como RUNX2, fator estimulante de colônia de macrófagos (M-CSF), RANKL e osteocalcina e pela ação da enzima fosfatase alcalina (Figura 4 A- D). Nos gráficos, as concentrações estão representadas em mol/m<sup>2</sup>.

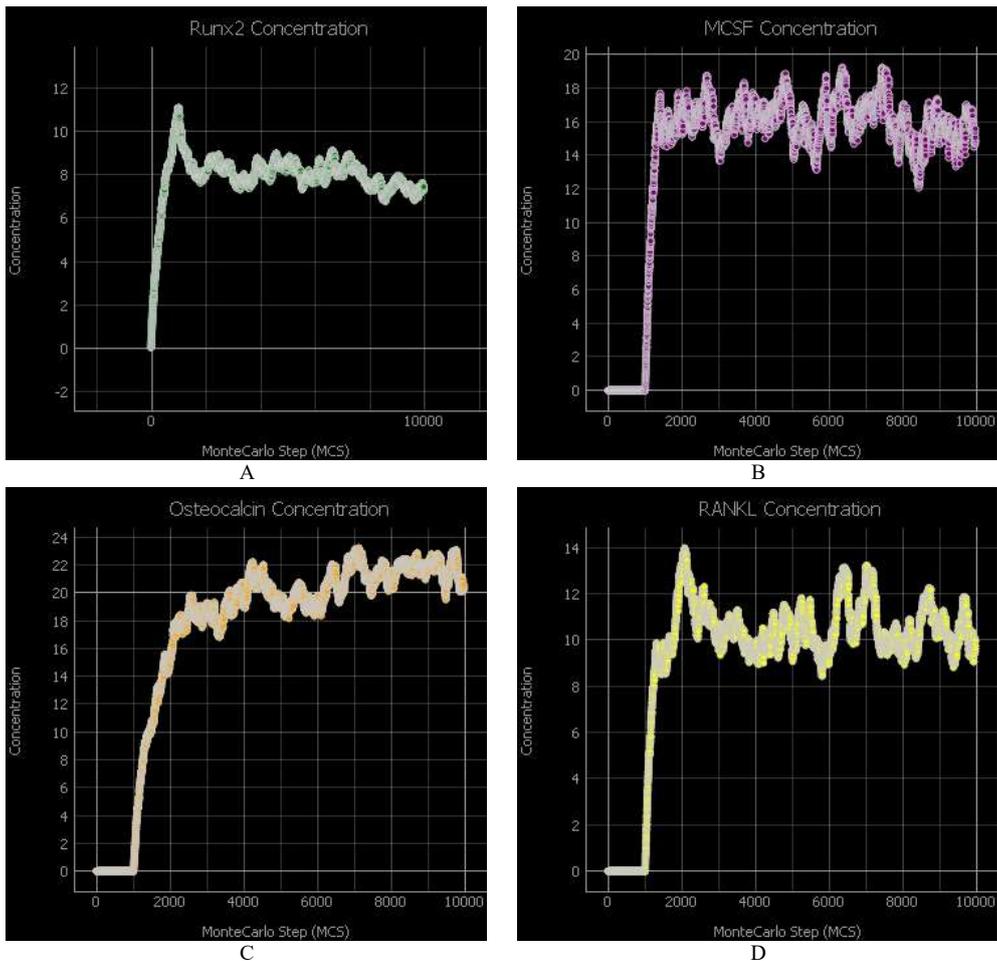


Figura 3: Simulação da secreção das principais citocinas relacionadas com o processo de diferenciação celular osteogênico. A: *Runt-related transcription factor 2* (RUNX2); B: fator estimulante de colônia de macrófagos (MCSF); C: osteocalcina; D: *Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand* (RANKL)

#### 4. Conclusão

Com o modelo computacional biológico desenvolvido foi possível simular a agregação celular das MSCs e CFU-GM, a fusão dos esferoides e também promover o processo de diferenciação celular destas células para a linhagem osteogênica, influenciada pela secreção de citocinas e pela enzima fosfatase alcalina. A análise quantitativa destes fatores bioquímicos está em andamento.

#### 5. Agradecimentos

Agradeço ao CNPQ/PCI e sua comissão gestora pela bolsa e a toda equipe do NT3D/CTI Renato Archer.

#### 6. Referências

- AGARWAL, R.; GARCÍA, A. J. Biomaterial strategies for engineering implants for enhanced osseointegration and bone repair. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 94, p. 53–62, 2015.
- ALBLAWI, A. et al. Scaffold-free: A developing technique in field of tissue engineering. **Computer Methods and Programs in Biomedicine**, v. 185, p. 105148, 2020.
- DHAWAN, A. et al. Three-dimensional bioprinting for bone and cartilage restoration in orthopaedic surgery. **Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons**, v. 27, n. 5, p. E215–E226, 2019.
- DORST, N. et al. Analysis of cellular composition of co-culture spheroids. **Annals of Anatomy**, v. 196, n. 5, p. 303–311, 2014.
- GRAYSON, W. L. et al. Stromal cells and stem cells in clinical bone regeneration. **Nat Rev Endocrinol**, v. 11, n. 3, p. 140–150, 2016.
- MANZINI, B. M. et al. Useful properties of undifferentiated mesenchymal stromal cells and adipose tissue as the source in liver-regenerative therapy studied in an animal model of severe acute fulminant hepatitis. **Cytotherapy**, v. 17, n. 8, p. 1052–1065, 2015.
- ROSETI, L. et al. Scaffolds for Bone Tissue Engineering: State of the art and new perspectives. **Materials Science and Engineering C**, v. 78, p. 1246–1262, 2017.
- SEGO, T. J. et al. A heuristic computational model of basic cellular processes and oxygenation during spheroid-dependent biofabrication. **Biofabrication**, v. 9, n. 2, p. 1–20, 2017.
- SU, P. et al. Mesenchymal stem cell migration during bone formation and bone diseases therapy. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 8, 2018.
- WU, Y.; ZHAO, L. Electrospun Poly ( Aspartic Acid ) -Modified Zein Nano fibers for Promoting Bone Regeneration. 2019.
- ZHAO, Z. et al. Minimally invasive implantation and decreased inflammation reduce osteoinduction of biomaterial. **Theranostics**, v. 10, n. 8, p. 3533–3545, 2020.