

Estudo de Fatores Biológicos em Modelo Computacional no Desenvolvimento de Tecido Ósseo em Ambiente *scaffold-free*

Júlia G. Blahun, Bruna M. Manzini, Izaque A. Maia, Pedro Y. Noritomi, Jorge V. L. da Silva.

{julia.blahun, b.manzini, izaque.maia, pnoritom, jvlsilva}@cti.gov.br

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

Abstract. *Tissue engineering is a promising alternative therapy for bone regeneration. The aim of this article is to analyze the inclusion of biological factors in the bone tissue development process in a scaffold-free environment. To achieve this, the Compucell3D software was used to simulate biological models, which analyzed the process of cell aggregation in spheroids containing mesenchymal stem cells (MSCs) and hematopoietic progenitor cells. In addition, the step of joining two spheroids and differentiating the cells present in the bone tissue was added, also considering a possible future analysis of enzymes and cytokines present in the complete spheroid.*

Resumo. *A engenharia de tecidos é uma terapia promissora alternativa para regeneração óssea. O objetivo deste artigo é analisar a inclusão de fatores biológicos no processo de desenvolvimento de tecido ósseo em ambiente scaffold-free. Para alcançá-lo, foi utilizado o software Compucell3D para simulação de modelos biológicos, que analisou o processo de agregação celular em esferóide contendo células-tronco mesenquimais (MSCs) e células progenitoras hematopoiéticas. Além disso, foi incluída a etapa de junção de dois esferóides e da diferenciação das células presentes no tecido ósseo e para a futura análise das enzimas e da citocina presente no esferóide completo.*

1. Introdução

A reconstrução esquelética de defeitos ósseos criados por trauma, infecção, ressecção de tumores e anormalidades esqueléticas, pode ser complexa. Até mesmo em casos de necrose avascular e osteoporose, o processo regenerativo é comprometido, podendo levar à cicatrização incompleta de fraturas e não à regenerar o tecido (1). Apesar do osso apresentar capacidade de auto regeneração, dependendo do tipo e complexidade da fratura, faz-se necessário intervenção cirúrgica que, em casos de grande falha óssea, pode requisitar preenchimento com material exógeno, comprometendo a eficácia da regeneração.

Tendo-se em conta essa dificuldade, a Engenharia de Tecidos se apresenta como uma importante alternativa na reestruturação óssea e restabelecimento de suas funções corporais. Ela vem ganhando espaço na ciência moderna desde a década de 80, quando surgiram os primeiros trabalhos na área. Ela estuda a reconstituição, conservação, substituição ou aprimoramento da função de um tecido ou órgão danificado, seja por doença ou trauma (2). A tríade clássica desta abordagem é cultivar células em uma matriz tridimensional (*scaffolds*), com a presença de fatores de crescimento e diferenciação, para implantação como substituto biológico por meio do cultivo.

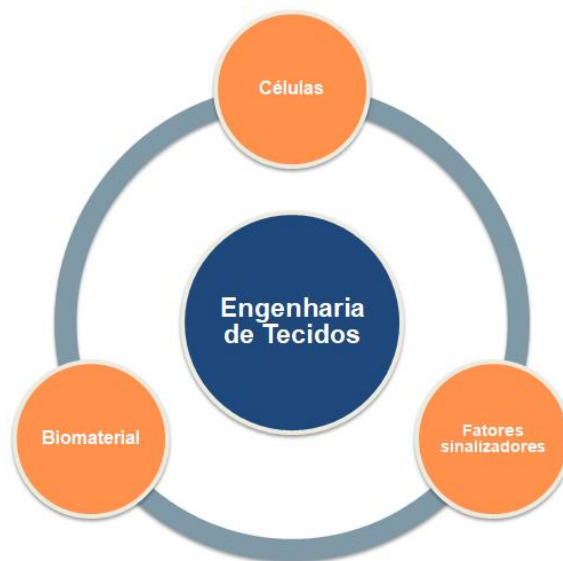


Figura 1: Tríade clássica da engenharia de tecidos.

No caso da engenharia de tecidos voltada para regeneração óssea, o processo é complexo e orquestrado por uma série de tipos celulares e sinalizações moleculares, a fim de otimizar o reparo e restaurar a função esquelética (3).

Particularidades do Tecido Ósseo

O tecido ósseo desempenha funções vitais no corpo, como a sustentação, locomoção e proteção dos órgãos. Além disso, ele possui a função de produção e hospedagem de células progenitoras hematopoiéticas e células-tronco mesenquimais, além de ser um depósito mineral, ou seja, é capaz de mobilizar os minerais armazenados em caso de carência, ou acumulá-los quando estão em excesso (4).

Todas essas funções são possíveis pois o osso consiste em um tipo de tecido conjuntivo rígido, dinâmico, altamente vascularizado, com a capacidade contínua de regeneração e remodelação, ou seja, ele está sempre sendo renovado. O tecido ósseo é constituído por uma matriz mineralizada formada por 3 tipos principais de células: osteoblastos, osteócitos e osteoclastos (Tabela 1). Durante a remodelação, os osteoblastos são responsáveis pela formação da matriz óssea e os osteoclastos pela sua reabsorção e digestão da matriz orgânica consistindo em um processo de eliminação do osso antigo e substituição por um novo (5). Os osteócitos são células derivadas dos osteoblastos e compreendem de 90 a 95% do tecido ósseo (3). Eles regulam a deposição mineral local e a química no nível da matriz óssea e são conhecidos por formarem uma rede sensorial que responde a estímulos externos, sendo considerados cruciais na remodelação

dinâmica do osso [6, 7, 8]. Esse processo é complexo e ocorre devido à ação de uma série de mecanismos celulares, como citocinas e fatores sinalizadores(3).

Proporções para cada tipo celular presente no tecido ósseo:

Tabela 1: Principais tipos celulares e proporções no tecido ósseo (3)

Tipo Celular	Proporção no Tecido
Osteócito	90-95%
Osteoblasto	4-6%
Mesenquimais (MSCs)	1%
Osteoclastos	1%
Unidade Formadora de Colônia- Granulócito/ Macrófago (CFU-GM)	0.5 %
Célula Precursora de Osteoclasto (OCP)	0.5 %

Tipos Celulares

Mesenquimais

As células-tronco Mesenquimais (MSCs) são caracterizadas por serem multipotentes, capazes de se diferenciar e contribuir na regeneração de tecidos ósseos, cartilagosos, músculos, ligamentos, tendões, adiposo, entre outros (6). Sua capacidade de formar e reparar ossos in vivo fez com que elas se tornassem atrativas para a medicina regenerativa. No tecido ósseo, as células MSCs se diferenciam e originam os osteoblastos por meio do fator regulador Runx2.

Osteoblastos

Os osteoblastos representam cerca de 4 a 6% do total de células ósseas e são os principais formadores da estrutura óssea (3). Eles são o estado final de diferenciação óssea das células-tronco Mesenquimais, que foram induzidas pela ação da enzima Fosfatase Alcalina óssea (3,7). Os osteoblastos são responsáveis pela mineralização da matriz óssea (7).

Osteócitos

Os osteócitos são derivados da linhagem mesodermal por meio da diferenciação dos Osteoblastos. Eles compreendem de 90 a 95% do tecido ósseo (3), sendo as células mais abundantes da matriz óssea. Ele é conhecido por ser uma célula mecanossensorial e têm sido considerados como mecanossensíveis nos estágios iniciais da remodelação óssea (8,9).

Unidade Formadora de Colônia- Granulócito/ Macrófago (CFU-GM)

A Unidade Formadora de Colônia Granulócito-Macrófago é uma célula multipotente que pode se diferenciar em OCPs a partir do fator estimulante de colônias de macrófagos (M-CSF) (10). No esferóide final de tecido ósseo, há menos de 1% de concentração celular de CFU-GM (3).

Células Progenitoras Hematopoiéticas (OCPs)

São gerados a partir da CFU-GM e são precursores de osteoclasto, se diferenciando a partir do fator ligante RANKL. Compõem menos de 1% do esferóide de tecido ósseo (3).

Osteoclastos

Os osteoclastos são células multinucleadas, provenientes das células progenitoras Hematopoiéticas. Eles são formados a partir da ação de fatores de diferenciação liberados pelas OCPs e do ligante Receptor Activator of Nuclear Factor kappa-B Ligand (RANKL), que é secretado por osteoblastos, osteócitos e células do estroma (3). Sua principal função diz respeito ao processo de reabsorção óssea e a maioria dos distúrbios esqueléticos se dão devido à uma irregularidade na atividade do osteoclasto. Como exemplo tem-se a Osteoporose, que está relacionada à diminuição do fenótipo de massa óssea e, conseqüentemente, à alta da atividade osteoclástica (11).

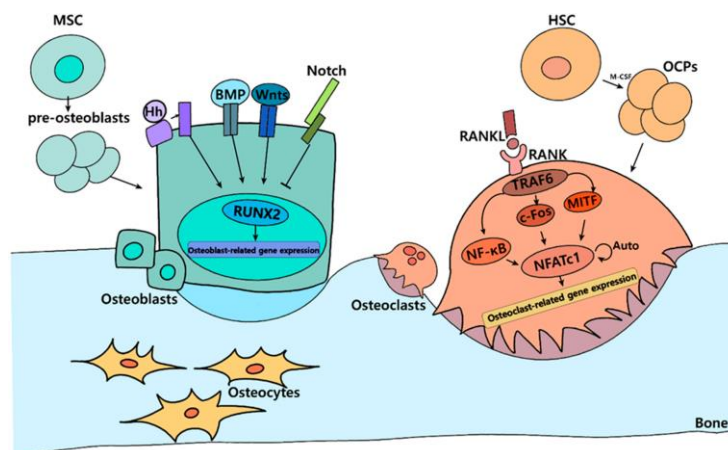


Figura 2: Esquemático do processo de diferenciação celular do tecido ósseo. Fonte: Yi, S.-J. 2019 (12).

Simulação computacional

Atualmente, grande parte dos processos fisiológicos complexos podem utilizar simulação computacional para serem elucidados. Esse método busca transformar conceitos e expressões matemáticas em modelos que simulam o comportamento das células, gerando hipóteses sobre o funcionamento dos sistemas biológicos. Essas hipóteses auxiliam na diminuição de tempo e número e, conseqüentemente, custo de experimentos em laboratório. O *software* livre *CompuCell3D* está disponível para este tipo de simulação e cujas utilizações para diferentes casos encontram-se listadas na tabela 2.

Tabela 2: Revisão bibliográfica das aplicações e respectivos resultados do *CompuCell3D*

Tipo de Aplicação	Descrição e Resultados	Referência
Verificação de Modelo de Crescimento Celular	Comparação entre um modelo híbrido e um clássico de crescimento celular no <i>Compucell3D</i> , para explicar a discrepância entre eles a partir de um mesmo sistema matemático. Não se pode inferir a diferença entre os modelos testados.	(13)
Modelo de Migração Celular de Mesenquimal	Reprodução de 3 tipos de movimento celular <i>in vitro</i> em simulações tridimensionais do <i>Compucell3D</i> . Como resultados, a trajetória das células na simulação tem forte acordo com os experimentos reais.	(14)
Modelo de Infecção Viral	Construção de um modelo computacional de infecção viral no tecido epitelial. A simulação elucidada como os tratamentos potenciais influenciam no resultado da infecção.	(15)
Modelo Tridimensional de Disseminação Tumoral	Modelo computacional experimental para investigar as interações entre epitélio de câncer e a matriz extracelular em microambientes compartilhados. Houve sucesso na distinção entre a dinâmica de crescimento coletivo e unicelular. Porém, não foi capaz de analisar a diferença da motilidade entre mesenquimais e amebóides.	(16)
Modelo de Transformação de Mesenquimal em Microambiente Tumoral	Estudo da presença de fibroblastos ativados derivados de endoteliais pela transformação da mesenquimal (EDAFs), e a rigidez de substrato na migração e proliferação de células tumorais. O modelo teve sucesso em prever que a migração de células tumorais aumenta na presença de EDAFs e mostra que a velocidade de ativação de células tumorais aumenta com o aumento da rigidez do substrato.	(17)
Simulação de Tecido Virtual para Doença Renal	Modelo computacional de tecido virtual para definir os papéis da adesão e proliferação no início da doença cística renal. As simulações previram que a adesão reduzida entre as células desencadeia a indução do cisto, o que foi confirmado <i>in vitro</i> .	(18)

Modelo Computacional de Cicatrização de Feridas	Modelo computacional de migração de queratinócitos, controlado por EGF (secretado por fibroblastos) usando o Modelo Celular de Potts (COM). Os resultados foram bem sucedidos no processo dinâmico de migração de queratinócitos e na elucidação da combinação de aspectos bioquímicos e mecânicos da migração celular.	(19)
Maturação e Cicatrização de Feridas	É construído um modelo no qual a deposição de matriz extracelular e a proliferação de fibroblastos determina a arquitetura dérmica. Os resultados do artigo mostraram que a interdependência entre a deposição da matriz extracelular e a proliferação celular coordenam a reparação dérmica.	(20)
Modelo de Fusão e Disrupção	Modelo computacional no <i>Compucell3D</i> que recapitula as redes celulares e o comportamento celular coletivo subjacente ao crescimento e fusão do palato secundário dos mamíferos. Uma análise <i>in silico</i> revelou a funcionalidade do modelo com relação a sistemas de sinalização celular e loops de feedback para crescimento e fusão.	(21)
Estudo da Influência da Tortuosidade de Vasos Sanguíneos em Tumores	Um modelo computacional de obstrução do fluxo sanguíneo na microevolução das células em um tecido canceroso foi construído. Além disso, foi mostrado que instabilidades no suprimento de sangue podem impactar no desenvolvimento de tumores e levar à extinção.	(22)
Formação de Esferoides de Células de Hepatocarcinoma	Um modelo de agregação de células Huh-7.5 foi desenvolvido para complementar o experimento de laboratório da formação de agregado esférico. O modelo computacional teve sucesso em fornecer uma visão interativa do processo de formação de esferoides.	(23)

Dada as possíveis aplicações biológicas do *software*, o objetivo deste artigo é analisar a agregação celular em esferóides no processo de desenvolvimento de tecido ósseo em ambiente *scaffold-free*, por meio de simulação computacional utilizando o *software Compucell3D*, visando suas possíveis aplicações na Engenharia de Tecidos voltada para a regeneração óssea.

Compucell3D

O modelo computacional do crescimento do tecido ósseo presente no artigo foi feito utilizando o *software Compucell3D*, o qual consiste em um ambiente tridimensional de simulação para problemas de biocomplexidade, utilizando modelos matemáticos para resolução de sistemas.

O código é feito utilizando a linguagem de programação Python. Um arquivo de simulação do *Compucell3D* possui 3 *scripts*: o primeiro é um arquivo XML que diz respeito às configurações iniciais da célula, como raio, tamanho do invólucro para simulação, volume inicial, tipos de célula, força de contato entre as células, entre outros. O segundo contém os Steppables da simulação, que são Classes em Python que contém as funções para o desenvolvimento celular, como mitose, diferenciação, morte, entre outras. O último arquivo importa todas as classes Steppables do arquivo anterior como funções para executar a simulação.

O principal arquivo da simulação é o que contém a construção dos Steppables. Eles são formados por três unidades principais: Start, Step e Finish. A simulação nesse *software* é feita usando Monte Carlo Steps (MCS), em que cada MCS executa a função Step de cada classe de Steppable. A função Start, caso desejada, executa o código presente nela após a simulação iniciar, mas antes do primeiro MCS, e a função Finish é chamada imediatamente após o último MCS (24). Além disso, as classes Steppables podem ser programadas para serem chamadas por intervalo de MCS.

Como dito anteriormente, no arquivo XML é definido os tipos celulares, além de suas interações moleculares, secreções de resíduos e diferenciadores, entre outros. Os tipos celulares utilizados neste código são: mesenquimais, osteoblastos, osteócitos, osteoclastos, unidades formadoras de colônia granulócito-macrófago e célula progenitora de osteoclasto.

2. Metodologia

2.1. Programação do *Compucell3D*

2.1.1. Código 1 – Formação de Esferoide

O trabalho foi dividido em dois programas do *Compucell3D*, um de formação de esferoide e outro de diferenciação celular. O primeiro código é iniciado com uma malha de 78 células espalhadas, contendo células-tronco Mesenquimais (Azul) e células progenitoras Hematopoiéticas (Verde) (Figura 3), em um invólucro de 100x100x1 μm para simulação, sendo uma simulação de 2 dimensões. A temperatura do meio é de 15.0 °C (Figura 4).

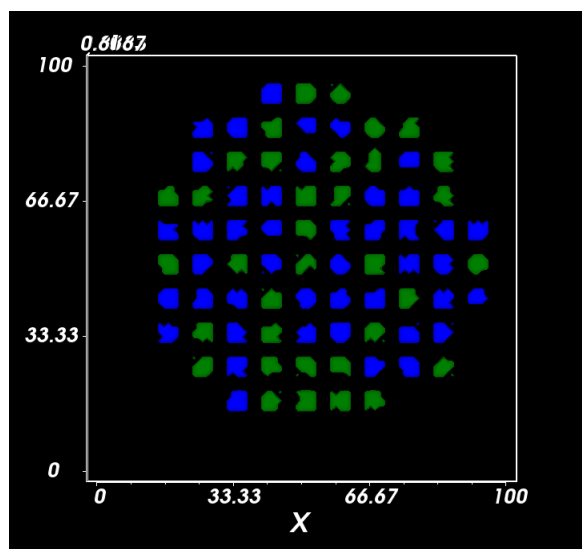


Figura 3: Configuração Inicial das Células no software CompuCell 3D.

```
<Potts>
  <Dimensions x="100" y="100" z="1"/>
  <Steps>100000</Steps>
  <Temperature>15</Temperature>
  <NeighborOrder>3</NeighborOrder>
</Potts>
```

Figura 4: Configurações iniciais do programa.

As células são declaradas com seus nomes e tipo celular por número (Figura 5). Além disso, o arquivo XML possui as definições de força moleculares (Figura 6). As forças são inversamente proporcionais entre as células, ou seja, quanto menor o valor presente nessa constante, mais forte será a interação entre elas.

```
<Plugin Name="CellType">
  <!-- Listing all cell types in the simulation -->
  <CellType TypeId="0" TypeName="Medium"/>
  <CellType TypeId="1" TypeName="Mesenchymal"/>
  <CellType TypeId="5" TypeName="CFUGM"/>
</Plugin>
```

Figura 5: Declaração dos tipos celulares no código 1.

```
<Plugin Name="Contact">
  <!-- Specification of adhesion energies -->
  <Energy Type1="Medium" Type2="Medium">0.0</Energy>
  <Energy Type1="Medium" Type2="Mesenchymal">10.0</Energy>
  <Energy Type1="Medium" Type2="CFUGM">10.0</Energy>

  <Energy Type1="Mesenchymal" Type2="Mesenchymal">1.0</Energy>
  <Energy Type1="Mesenchymal" Type2="CFUGM">1.0</Energy>

  <Energy Type1="CFUGM" Type2="CFUGM">1.0</Energy>
</Plugin>
```

Figura 6: Definição das forças intermoleculares no código 1.

Por fim, para a primeira parte, apenas uma função de motilidade é necessária. Isso faz-se devido à necessidade de as células se locomoverem até se juntarem em um único esferoide. Essa função é mostrada abaixo:

```
class MotilitySteppable(SteppableBasePy):

    def __init__(self, frequency=1):

        SteppableBasePy.__init__(self, frequency)

    def start(self):
        for cell in self.cellList:
            self.polarizationVectorPlugin.setPolarizationVector(cell, 1, 1, 0)
            self.cellOrientationPlugin.setLambdaCellOrientation(cell, 64)
```

Figura 7: Função de Motilidade no código de formação de esferoide.

2.1.2. Código 1 – Formação de Esferoide

O segundo programa apresenta o código necessário para induzir a diferenciação das células. Ele inicia a partir de dois esferóides retirados do primeiro programa, buscando juntar os esferóides e diferenciar as células presentes nele durante esse processo. Tendo isso em mente, é necessário que esse código tenha todas as células do esferóide de tecido ósseo para que o *CompuCell3D* possa realizar a diferenciação:

```
<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"/>
</Plugin>
```

Figura 8: Células presentes no código de diferenciação celular.

Também, com todas as células presentes, é necessário definir a força intermolecular entre todas elas, adicionando algumas linhas no *Plugin de Contact* no XML:

```
<Plugin Name="Contact">

    <!-- Specification of adhesion energies -->
    <Energy Type1="Medium" Type2="Medium">0.0</Energy>
    <Energy Type1="Medium" Type2="Mesenchymal">10.0</Energy>
    <Energy Type1="Medium" Type2="Osteoblast">6.0</Energy>
    <Energy Type1="Medium" Type2="Osteocyte">10.0</Energy>
    <Energy Type1="Medium" Type2="Matrix">10.0</Energy>
    <Energy Type1="Medium" Type2="CFUGM">10.0</Energy>
    <Energy Type1="Medium" Type2="OCP">10.0</Energy>
    <Energy Type1="Medium" Type2="Osteoclast">10.0</Energy>
```

Figura 9: Forças intermoleculares no esferóide de tecido ósseo.

Por último, no arquivo *XML* também está presente a secreção e decaimento das citocinas e enzimas, ou seja, qual tipo celular secreta o composto e onde elas irão atuar e, conseqüentemente, decair de valor (Figura 10).

```
<DiffusionField Name="RUNX2">
  <DiffusionData>
    <FieldName>RUNX2</FieldName>
    <InitialConcentrationExpression>0.0</InitialConcentrationExpression>
    <GlobalDiffusionConstant>0.2</GlobalDiffusionConstant>
    <GlobalDecayConstant>0.001</GlobalDecayConstant>
    <DecayCoefficient CellType="Osteoblast">0.002</DecayCoefficient>
    <DiffusionCoefficient CellType="Mesenchymal">0.0</DiffusionCoefficient>
  </DiffusionData>
  <SecretionData>
    <Secretion Type="Mesenchymal">0.27</Secretion>
  </SecretionData>
  <BoundaryConditions>
    <Plane Axis="X">
      <Periodic/>
    </Plane>
    <Plane Axis="Y">
      <Periodic/>
    </Plane>
  </BoundaryConditions>
</DiffusionField>
```

Figura 10: Código para definir a secreção de citocinas

Conforme dito na introdução, a diferenciação é induzida na célula a partir da concentração de enzimas e citocinas, onde a célula multipotente Mesenquimal se transforma em Osteoblasto, o qual se diferencia em Osteócito, e as células CFU-GM se transformam em OCP, que se tornam Osteoclastos no final. As funções do código do segundo programa estão discretizadas a seguir:

2.1.2.1. Constraint Initializer Steppable

É a primeira função do programa. Ela apenas define o volume de cada célula individual do programa em uma função *Start*, que será executada apenas uma vez durante todo o código.

2.1.2.2. Motility Steppable

É a mesma função do código 1. Ela ajudará os dois esferoides a se locomoverem até formar apenas um esferoide, considerando também as forças intercelulares definidas no arquivo XML.

2.1.2.3. Differentiation Steppable

É a função que diferencia uma célula à outra, transformando MSCs em Osteoblastos, Osteoblastos em Osteócitos, Hematopoiéticas em Osteoprogenitoras e as últimas em Osteoclastos (Figura 11). Cada transformação celular ocorre devido à secreção de um fator biológico de diferenciação, representado na figura abaixo:

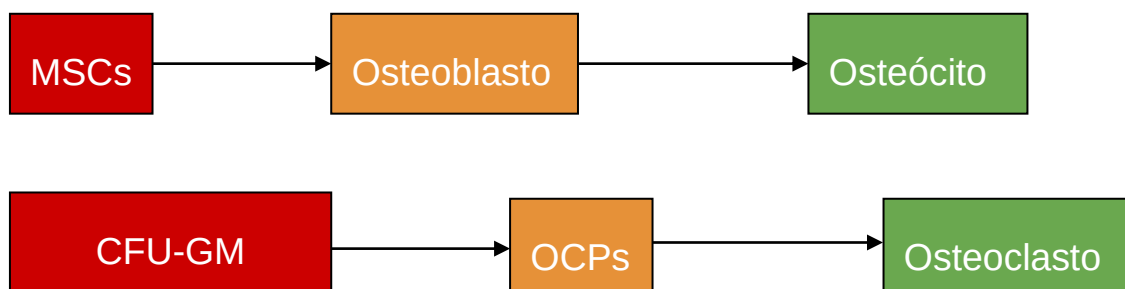


Figura 11: Processo de diferenciação das células-tronco mesenquimais e células progenitoras.

Para diferenciação celular, o código deve pegar a concentração da enzima ou citocina dentro do invólucro da célula e, caso você tenha uma concentração maior que o valor de diferenciação, a célula do tipo X se transformará na célula do tipo Y . Os valores de concentração foram retirados a partir de testes com diferentes valores, tendo como meta chegar nas proporções celulares do tecido ósseo mostradas da Tabela 1.

Uma parte do código deste *steppable* é mostrado na Figura 12, a qual demonstra a diferenciação entre Osteoblastos e Osteócitos, induzida pela concentração da Fosfatase Alcalina:

```
# self.scalarField2=CompuCell.getConcentrationField(self.simulator,"PhosphAlka")
field2=CompuCell.getConcentrationField(self.simulator,"PhosphAlka")
pt2=CompuCell.Point3D()
list = []

for cell in self.cellList:
    pt2.x=int(cell.xCOM)
    pt2.y=int(cell.yCOM)
    pt2.z=int(cell.zCOM)
    concentrationAtCOM2=field2.get(pt2)
    list.append(concentrationAtCOM2)

    if cell.type == 2:
        # Concentracao de Fosfatase Alcalina induz diferenciacao para tipo 3
        if concentrationAtCOM2 >= 6.5 and random.random()<0.94:
            cell.type = 3
```

Figura 12: Código para definir a concentração de citocinas e mudança de tipo celular.

2.1.2.4. Plot Graphic Steppable

É o passo em que os gráficos auxiliares da simulação são plotados. Eles ajudam a enxergar se a simulação se aproxima ao esperado em laboratório, a quantidade de enzimas e citocinas presentes no meio, a porção de cada célula no esferóide, entre outros. É também a classe que permite extrair análises quantitativas fundamentais para examinar a interrelação dos fatores bioquímicos e a relação destes com as células geradas no modelo.

3. Resultados

Em vista de tudo dito acima, no primeiro programa as células estão presentes em uma rede solta que gradualmente se agrega a um único esferóide. Durante o processo, não há o crescimento celular em tamanho, mas as células se unem devido à força molecular existente entre elas e se tornam uma estrutura compactada (25). Ao final dele, haverá apenas um esferóide contendo os dois tipos celulares (Figura 13). Esse processo pode ser comparado ao obtido em experimento de laboratório encontrado na bibliografia, assim como mostra a Figura 14.

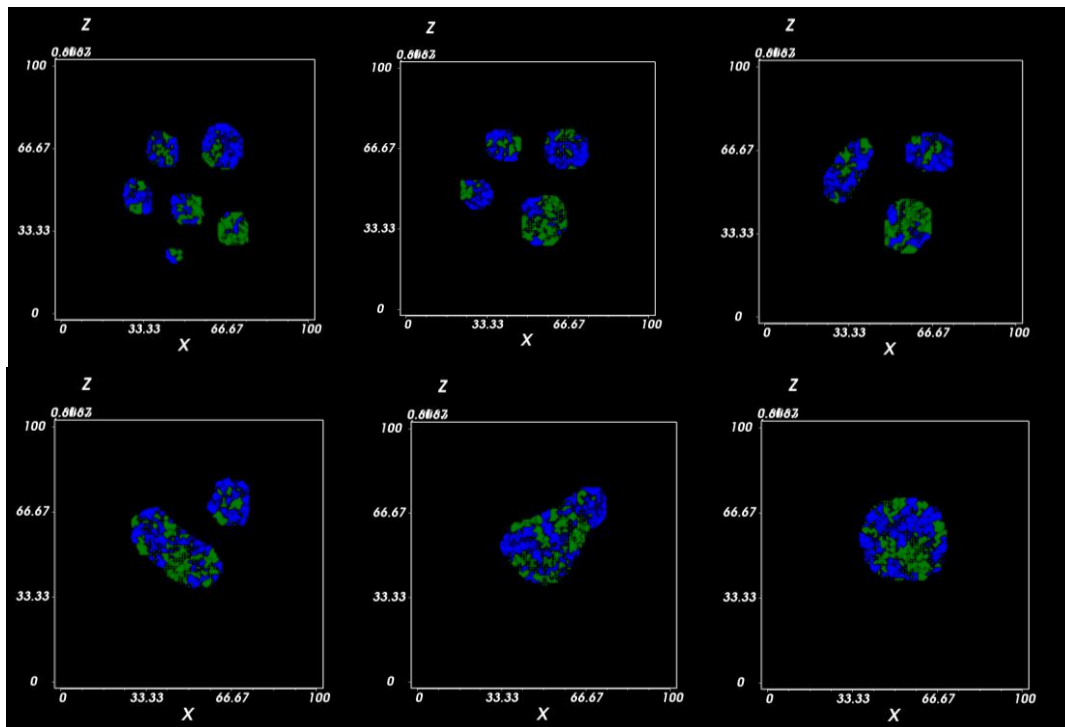


Figura 13: Processo de agregação celular.

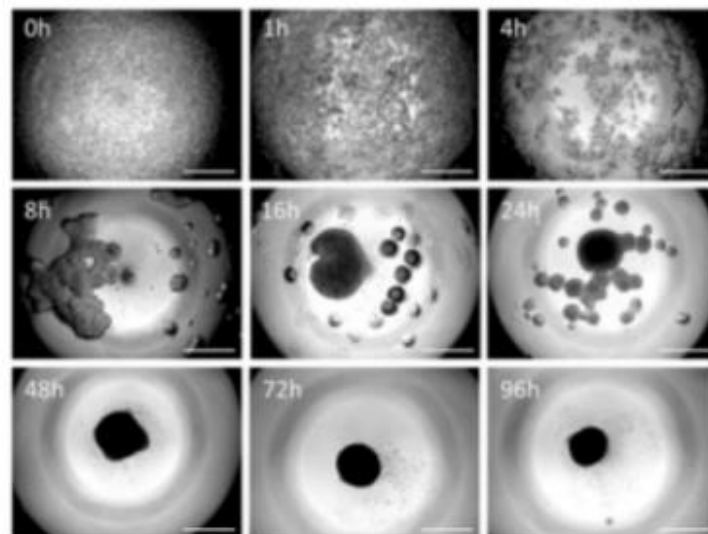
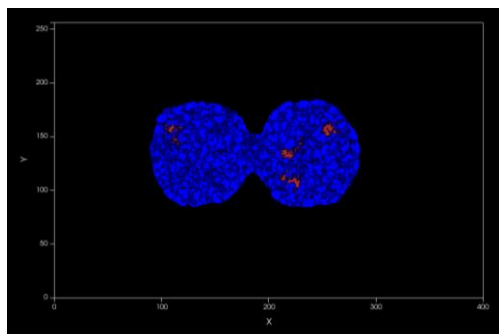
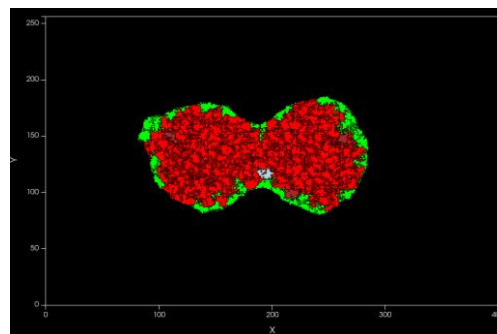


Figura 14: Processo de agregação celular obtida em laboratório. Fonte: Bartosh, T.J, 2010 (25).

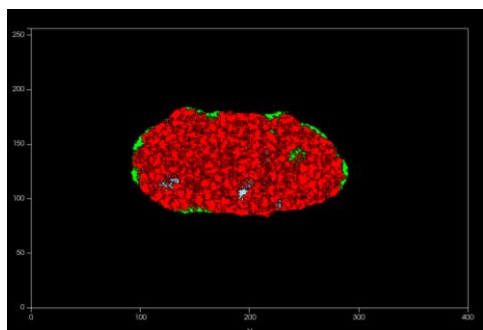
Já como resultados no código 2, temos o desenvolvimento de um único esferoide gerado a partir da união de 2 esferóides do Código 1. Para a diferenciação, há uma proporção entre as quantidades de cada célula presente no esferóide retirado da literatura, conforme a Tabela 1. Essas proporções foram consideradas para definir o valor das constantes de difusão e decaimento dos fatores sinalizadores de modo a atingir um valor próximo ao da proporção ideal, ou seja, o número de células de cada tipo presentes no esferóide tende à proporcionalidade prevista na literatura. As imagens da simulação são mostradas a seguir:



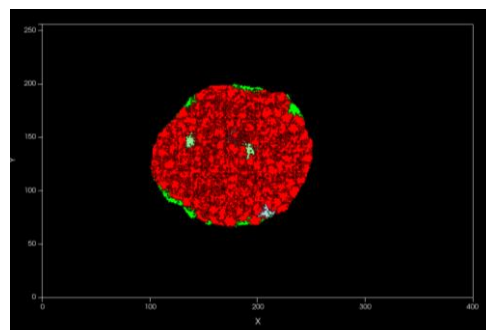
a) Início da simulação com dois esféróides formados por células Mesenquimais (azul) e CFU-GM (vermelho escuro)



b) Início da fusão dos esféróides e diferenciação celular. Em destaque: Osteócitos (vermelho), Osteoblastos (Verde).



c) Continuação do processo de fusão de esféróides e diferenciação. Percebe-se a maior presença de Osteócitos (vermelho), assim como a literatura prevê.



d) Esféróide formado após 13000 MCS. Concentração aproximada de 93% de Osteócito, 3% de Osteoblasto, 1% de Mesenquimal, 0.5% de CFU-GM, 0.5% de OCP, 1% de Osteoclasto.

Figura 15: Etapas da simulação de diferenciação

Além disso, o programa permite algumas análises da interferência da concentração de certas células com as taxas de decaimento das citocinas e enzimas, podendo gerar gráficos que nos permitem analisar tais valores.

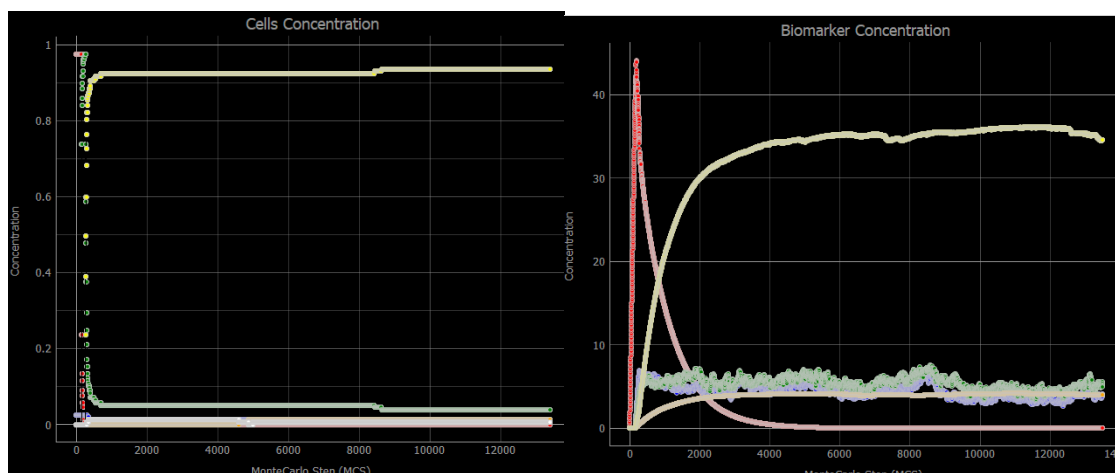


Figura 16: gráficos gerados pelo *Compucell3D*. À esquerda, há a representação da concentração celular em função do número de *Monte Carlo Steps*. À direita, é mostrado a concentração de citocinas e enzima (*Runx2*) em função do número de *Monte Carlo Steps*.

4. Conclusão

A regeneração óssea pode ser insuficiente em alguns casos de lesões ou doenças, portanto faz-se necessário a utilização de métodos artificiais de reconstrução. Dado isso, a Engenharia de Tecidos pode ter um importante papel na reestruturação óssea e restabelecimento de suas funções corporais. Para prever o crescimento do tecido ósseo nessa abordagem, há simulações computacionais simplificadas para descrever o comportamento e as interações a nível celular *in silico*. Assim, é possível observar o desenvolvimento do tecido pois o código possui os atributos necessários para se mover, diferenciar e secretar e reagir a fatores bioquímicos.

Portanto, após a confecção do programa e até o presente momento, foi observado que as células possuem a capacidade de se agregar, formando um esferóide. *In vitro*, as células suspensas no meio de cultura também possuem o mesmo comportamento, assumindo uma formação tridimensional. Além disso, elas possuem a capacidade de se diferenciar a partir da concentração de certos biomarcadores que sinalizam esse processo, formando um único esferóide com células-tronco Mesenquimais, Osteoblastos, Osteócitos, CFU-GM, OCPs e Osteoclastos.

Esse modelo pode auxiliar quali- e quantitativamente nos estudos da Engenharia de Tecidos, pois prevê o comportamento celular em um ambiente *scaffold-free*, voltado para o processo de reconstituição óssea. Em uma outra linha de pesquisa, há a possibilidade de analisar a influência na mudança desses valores na construção do esferoide de tecido ósseo, variando a concentração de uma célula.

Referências

1. Dimitriou R, Jones E, McGonagle D, Giannoudis P V. Bone regeneration: Current concepts and future directions. BMC Med [Internet]. 2011;9(1):66. Available from: <http://www.biomedcentral.com/1741-7015/9/66>
2. Nancy G, Perea R. Desenvolvimento e caracterização de scaffolds tridimensionais hierárquicos pelo processo de bioextrusão e eletrofiação. Desenvolvimento e caracterização de scaffolds tridimensionais hierárquicos pelo processo de bioextrusão e eletrofiação. 2015;
3. Florencio-Silva R, Sasso GRDS, Sasso-Cerri E, Simões MJ, Cerri PS. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. Biomed Res Int. 2015;2015.
4. Gonçalves E. Scaffolds Inteligentes e Reforçados para Medicina Regenerativa Óssea. 2012;
5. Judas F, Palma P, Falacho R, Figueiredo H. Estrutura E Dinâmica Do Tecido Ósseo. Cerâmica. 2012;51.
6. Manzini BM, Machado LMR, Noritomi PY, da Silva JVL. Advances in Bone tissue engineering: A fundamental review. J Biosci. 2021;46(1).
7. Heino T, Hentunen T. Differentiation of Osteoblasts and Osteocytes from Mesenchymal Stem Cells. Curr Stem Cell Res Ther. 2008;3(2):131–45.
8. Bonewald LF. The amazing osteocyte. J Bone Miner Res. 2011;26(2):229–38.

9. Takano-Yamamoto T. Osteocyte function under compressive mechanical force. *Jpn Dent Sci Rev* [Internet]. 2014;50(2):29–39. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jdsr.2013.10.004>
10. Mena C, Kurihara N, Roodman GD. CFU-GM-derived cells form osteoclasts at a very high efficiency. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;267(3):943–6.
11. Faulkner B, Astleford K, Mansky KC. Regulation of osteoclast differentiation and skeletal maintenance by histone deacetylases. *Molecules*. 2019;24(7):1–18.
12. Yi SJ, Lee H, Lee J, Lee K, Kim J, Kim Y, et al. Bone remodeling: Histone modifications as fate determinants of bone cell differentiation. *Int J Mol Sci*. 2019;20(13).
13. Sego TJ, Glazier JA, Tovar A. Unification of aggregate growth models by emergence from cellular and intracellular mechanisms: Unification of Aggregate Growth Models. *R Soc Open Sci*. 2020;7(8).
14. Fortuna I, Perrone GC, Krug MS, Susin E, Belmonte JM, Thomas GL, et al. CompuCell3D Simulations Reproduce Mesenchymal Cell Migration on Flat Substrates. *Biophys J* [Internet]. 2020;118(11):2801–15. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2020.04.024>
15. Sego TJ, Aponte-Serrano JO, Gianlupi JF, Heaps SR, Breithaupt K, Brusch L, et al. A modular framework for multiscale, multicellular, spatiotemporal modeling of acute primary viral infection and immune response in epithelial tissues and its application to drug therapy timing and effectiveness [Internet]. Vol. 16, *PLoS Computational Biology*. 2020. 1–51 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pcbi.1008451>
16. Bhat R, Pally D, Pramanik D. An interplay between reaction-diffusion and cell-matrix adhesion regulates multiscale invasion in early breast carcinomatosis. *Front Physiol*. 2019;10(JUN):1–15.
17. Chowkwale M, Mahler GJ, Huang P, Murray BT. A multiscale in silico model of endothelial to mesenchymal transformation in a tumor microenvironment. *J Theor Biol*. 2019;480:229–40.
18. Belmonte JM, Clendenon SG, Oliveira GM, Swat MH, Greene E V., Jeyaraman S, et al. Virtual-Tissue computer simulations define the roles of cell adhesion and proliferation in the onset of kidney cystic disease. *Mol Biol Cell*. 2016;27(22):3673–85.
19. Andasari V, Swat M, Feng S, Spill F, Chen L, Luo X, et al. HHS Public Access. 2019;10(10):605–34.
20. Rognoni E, Pisco AO, Hiratsuka T, Sipilä KH, Belmonte JM, Mobasser SA, et al. Fibroblast state switching orchestrates dermal maturation and wound healing. *Mol Syst Biol*. 2018;14(8):1–20.
21. Hutson MS, Leung MCK, Baker NC, Spencer RM, Knudsen TB. Computational Model of Secondary Palate Fusion and Disruption. *Chem Res Toxicol*. 2017;30(4):965–79.
22. Szabó A, Merks RMH. Blood vessel tortuosity selects against evolution of aggressive tumor cells in confined tissue environments: A modeling approach. Vol. 13, *PLoS Computational Biology*. 2017. 1–32 p.

23. Wang Y, Kim MH, Tabaei SR, Park JH, Na K, Chung S, et al. Spheroid formation of hepatocarcinoma cells in microwells: Experiments and Monte Carlo simulations. PLoS One. 2016;11(8):1–13.
24. Swat M, Belmonte J, Glazier JA. Python Scripting Manual for CC3D v.4.1.1. 2020;
25. Bartosh TJ, Ylöstalo JH, Mohammadipoor A, Bazhanov N, Coble K, Claypool K, et al. Aggregation of human mesenchymal stromal cells (MSCs) into 3D spheroids enhances their antiinflammatory properties. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010;107(31):13724–9.