

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
ESCOLA DE ARTES, CIÊNCIAS E HUMANIDADES  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MODELAGEM DE SISTEMAS COMPLEXOS

WILLER FERREIRA DA SILVA JUNIOR

**Cultura de células 3D *in silico* por meio de técnicas de Modelagem Baseada em Agentes:  
aplicações em engenharia de tecidos**

São Paulo

2021

WILLER FERREIRA DA SILVA JUNIOR

**Cultura de células 3D *in silico* por meio de técnicas de Modelagem Baseada em Agentes:  
aplicações em engenharia de tecidos**

Versão corrigida

Dissertação apresentada à Escola de Artes, Ciências e Humanidades da Universidade de São Paulo como requisito de obtenção do título de Mestre em Ciências do Programa de Pós-graduação em Modelagem de Sistemas Complexos.

Versão corrigida contendo as alterações solicitadas pela comissão julgadora em 17 de setembro de 2021. A versão original encontra-se em acervo reservado na Biblioteca da EACH/USP e na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD), de acordo com a Resolução CoPGr 6018, de 13 de outubro de 2011.

Área de Concentração:

Sistemas Complexos

Orientador:

Prof. Dr. Fernando Fagundes Ferreira

São Paulo

2021

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca da Escola de Artes, Ciências e Humanidades, EACH/USP, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Silva Junior, Willer Ferreira da  
Cultura de células 3D in silico por meio de técnicas de Modelagem Baseada em Agentes: aplicações em engenharia de tecidos / Willer Ferreira da Silva Junior; orientador, Fernando Fagundes Ferreira. -- São Paulo, 2021.  
142 p: il.

Dissertacao (Mestrado em Ciencias) - Programa de Pós-Graduação em Modelagem de Sistemas Complexos, Escola de Artes, Ciências e Humanidades, Universidade de São Paulo, 2021.  
Versão corrigida

1. Engenharia tecidual. 2. Sistemas complexos. 3. Bioprocessos. 4. Biologia celular. I. Ferreira, Fernando Fagundes, orient. II. Título.

Nome: SILVA JUNIOR, Willer Ferreira da

Título: Cultura de células 3D *in silico* por meio de técnicas de Modelagem Baseada em Agentes:  
aplicações em engenharia de tecidos

Dissertação apresentada à Escola de Artes,  
Ciências e Humanidades da Universidade de  
São Paulo como requisito de obtenção do título  
de Mestre em Ciências do Programa de Pós-  
graduação em Modelagem de Sistemas  
Complexos.

Área de Concentração:  
Sistemas Complexos

Aprovado em: 17 / 09 / 2021

### Banca Examinadora

Prof. Dr. Fernando Fagundes      Instituição: Universidade de São Paulo  
Ferreira

Julgamento: \_\_\_\_\_      Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof./a. Daniela Leite Fabrino      Instituição: Universidade Federal de São  
Dr./a. João del Rei

Julgamento: \_\_\_\_\_      Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof./a. Erika L. F. Costa de      Instituição: Universidade Federal de São  
Dr./a. Alvarenga      João del Rei

Julgamento: \_\_\_\_\_      Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. Camilo Rodrigues Neto      Instituição: Universidade de São Paulo

Julgamento: \_\_\_\_\_      Assinatura: \_\_\_\_\_

*To my favorite and beloved philosopher...*

## **Agradecimentos**

Agradeço primeiramente, e sempre, a todos os professores que encontrei ao longo da vida, pelos inúmeros aprendizados, afetos e atenção, os quais me impactaram e transformaram profundamente. Também, pelo entusiasmo (muitas vezes emocionante), resiliência e determinação de muitos deles no ofício do ensino, mesmo em circunstâncias tão adversas e injustas, que marcam a história da educação no nosso país.

Agradeço também:

Às mulheres nas quais sempre me inspirei de vários modos: Maria Beatriz da Silva, Flávia Ferreira da Silva e Fabiane Ferreira da Silva.

Ao meu filósofo predileto, Fábio Moreira Vargas, pelo apoio, diálogos e reflexões sobre filosofia da ciência, sociologia e psicanálise, os quais foram fundamentais para a concepção, desenvolvimento e conclusão destes projetos.

Ao Prof. Dr. Fernando Fagundes Ferreira, pelo acolhimento, orientação cuidadosa, paciência, conselhos e oportunidade de desenvolver este projeto sob sua supervisão.

À coordenação e secretaria do programa de Modelagem de Sistemas Complexos, bem como aos professores do programa e servidores da EACH, pela experiência acadêmica proporcionada ao longo desses anos.

Aos Prof(a)s Dr(a)s Daniela Leite Fabrino, Erika Costa de Alvarenga e Camilo Rodrigues Neto pelas ricas contribuições para este trabalho.

À Juliana Varella, Fernanda Khamis Fiorani Santana e Monique Mantovani, pelo apoio, incentivo aos estudos e desenvolvimento humano. Obrigado por humanizarem a dinâmica e ambiente corporativos.

Aos profs que também tiveram grande importância em minha formação e interesse pelo tema do projeto: José Carlos de Magalhães, Bruna Mara Aparecida de Carvalho, Daniela Leite Fabrino e Edson Romano Nucci. Obrigado pelos ensinamentos, reflexões, amizade e excelentes memórias proporcionados.

*“O complexo deve ser concebido como o primeiro elemento existente. Daí resulta que é preciso primeiro examinar o complexo enquanto complexo e passar em seguida a seus elementos e processos elementares”*

(MORIN, 2007, p. 15)

*“O sujeito emerge ao mesmo tempo que o mundo. Ele emerge desde o ponto de partida sistêmico e cibernético, lá onde certo número de traços próprios aos sujeitos humanos [...] são incluídos no objeto máquina. Ele emerge, sobretudo, a partir da auto-organização, onde autonomia, individualidade, complexidade, incerteza, ambiguidade tornam-se caracteres próprios do objeto. Onde sobretudo, o termo “auto” traz em si a raiz da subjetividade. Desde então, pode-se conceber, sem que haja um fosso epistêmico intransponível, que a auto referência desemboque na consciência de si, que a reflexividade desemboque na reflexão, em resumo, que apareçam “sistemas” dotados de uma capacidade tão alta de auto-organização que produzam uma misteriosa qualidade chamada consciência de si.”*

(MORIN, 2007, p. 38)

## RESUMO

SILVA JUNIOR, Willer Ferreira da. **Cultura de células 3D *in silico* por meio de técnicas de Modelagem Baseada em Agentes**: aplicações em engenharia de tecidos. 2021. 142 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Artes, Ciências e Humanidades, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021. Versão corrigida.

Diferentes estudos têm demonstrado a importância de se analisar o comportamento celular em estruturas tridimensionais por uma perspectiva complexa. A maior parte dos modelos avalia regras específicas de comportamento e/ou desconsideram características fundamentais das células ou de suas interações e comunicações com o entorno. Portanto, este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de um modelo baseado em agentes (MBA) que abarque os comportamentos celulares fundamentais em meio a um arcabouço de estrutura porosa. O modelo computacional desenvolvido possui dois eixos principais: 1) modelagem e análise de arcabouços e 2) modelagem e análise do sistema biológico. Células, nutrientes, fatores de crescimento e metabólitos foram considerados agentes e descritos por listas de informações individuais; células se movimentam pelos poros do arcabouço por quimiotaxia e interagem com os demais agentes e estrutura de sustentação, consumindo oxigênio, glicose e lactato de acordo com a via glicolítica; outros comportamentos como inibição por contato, produção e remodelagem de matriz extracelular também foram modelados. A análise de propriedades de arcabouços de dimensões 12 x 12 x 1000 *voxels* de diferentes porosidades, por meio da técnica de *bootstrapping* mostrou que *voxels* com diâmetro de 20 µm resultam em arcabouços com propriedades mecânicas e fluido dinâmicas similares às encontradas em modelos *in vitro* e *in vivo*; além disso, a simulação de cultivos de tecidos pelo modelo com *voxels* de 20 µm apresentaram maiores valores de preenchimento do arcabouço por células e matriz extracelular, bem como maior taxa de crescimento e complexidade energética do sistema. A simulação do cultivo de células estaminais humanas derivadas de medula óssea utilizando parâmetros de um modelo *in vitro* reproduziu o comportamento de crescimento celular observado no estudo de referência, tanto no regime de cultivo em perfusão, quanto no estático. Portanto, o MBA desenvolvido neste projeto pode ser empregado na investigação preliminar de fenômenos biológicos ou de viabilidade de condições de cultivo de tecido.

Palavras-chave: Sistemas complexos. Modelagem Baseada em Agentes. Engenharia de Tecidos. Bioprocessos. Biologia Celular.



## ABSTRACT

SILVA JUNIOR, Willer Ferreira da. ***In silico* 3D cell culture through Agent Based**

**Modeling techniques:** applications in tissue engineering. 2021. 142 p. Dissertation (Master of Science) – School of Arts, Sciences and Humanities, University of São Paulo, São Paulo, 2021. Corrected version.

Different studies have demonstrated the importance of analyzing the cellular behavior in three-dimensional structures through the complexity perspective. Most of the current models evaluate specific rules of cells' behavior and/or disregard key characteristics of cells or their interactions and communications with the surrounding environment. Therefore, this work aims to develop an agent-based model (ABM) that includes key cellular behaviors in a porous scaffold. The developed computational model was divided into two main branches: 1) modeling and analysis of scaffolds and 2) modeling and analysis of the biological system. Cells, nutrients, growth factors and metabolites were considered agents and described by individual lists of information; cells move through the pores of the scaffold by chemotaxis and interact with the other agents and scaffold, consuming oxygen, glucose, and lactate, according to the glycolytic pathway; other behaviors such as contact inhibition, production and remodeling of extracellular matrix were also modeled. The analysis of the scaffold's properties (with dimensions 12 x 12 x 1000 voxels and different porosities), through the bootstrapping technique, showed that voxels with a diameter of 20  $\mu\text{m}$  result in scaffolds with mechanical and fluid dynamic properties similar to those found in *in vitro* and *in vivo* models; in addition, the simulation of tissue cultures by the model with voxels of 20  $\mu\text{m}$  showed higher values of scaffold filling by cells and extracellular matrix, as well as higher growth rate and system's energy complexity. The simulation of the culture of human stem cells derived from bone marrow using parameters of an *in vitro* model reproduced the cell growth behavior observed in the reference study, both in the perfusion and static cultivation regime. Therefore, the ABM herein described can be used in preliminary investigations of biologic phenomena or viability of tissue culture under specific cell culture conditions.

Keywords: Complex systems. Agent Based Modeling. Tissue Engineering. Bioprocesses. Cellular Biology.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mapa aumentado das principais vias metabólicas humanas focalizado no ciclo de Krebs.....	21
Figura 2 - Perfil de produtos de engenharia de tecido ao longo do tempo .....	32
Figura 3 - Distribuição de empresas e tipos de produtos de engenharia de tecidos pelo mundo .....	33
Figura 4 – Representação da integração de modelos baseados em agentes no desenvolvimento de tecidos .....	43
Figura 5 - Representação das estruturas de poros do tipo Cubo, FX, FD, BC, FXBC, Octa, Octet, V-Octet, T-Cube e T-Octa .....	45
Figura 6 - Representação do scaffold (população de dados), <i>bootstrapping</i> ( $B$ amostragens de tamanho $N$ ) e vizinhança de Moore (2D e 3D) utilizados para o cálculo do tamanho de poros e demais parâmetros .....	54
Figura 7 - Representação dos algoritmos de cálculo de área de superfície ( $S$ ) e tamanho de poro ( $\Phi$ ) .....	57
Figura 8 – Representação do catabolismo da glicose por células eucariotas, baseado nos resultados experimentais dos últimos 30 anos.....	64
Figura 9 - Fluxograma de decisão dos agentes do tipo célula .....	67
Figura 10 - Scaffold produzido pelo algoritmo desenvolvido, com dimensões $x_{max} = 12$ , $y_{max} = 12$ , $z_{max} = 1000$ . .....	77
Figura 11 – Cortes transversais dos <i>scaffolds</i> a diferentes níveis de porosidade .....	77
Figura 12 - Intervalo de estabilidade da porosidade calculada/medida <i>versus</i> porosidade teórica .....	78
Figura 13 - Intervalo de estabilidade do tamanho dos poros por porosidade teórica, para diferentes valores de $d$ . .....	81
Figura 14 - Variação da razão S/V em função do tamanho dos poros .....	84
Figura 15 - Intervalo de estabilidade dos valores de permeabilidade <i>versus</i> porosidade .....	85
Figura 16 – Razão área de superfície/volume em diferentes valores de porosidade.....	86
Figura 17 - Resistência dos <i>scaffolds</i> de diferentes materiais em função da porosidade .....	88
Figura 18 - Distribuição de probabilidade de normalidade dos resíduos .....	93
Figura 19 - Indicadores de desempenho <i>vs</i> parâmetros variáveis .....	95
Figura 20 - Variação da área de superfície com a porosidade e diâmetro do voxel.....	96
Figura 21 - Indicadores de complexidade <i>vs</i> parâmetros variáveis.....	97

Figura 22 - Complexidade energética medida a cada unidade de tempo $t_n$ .....	98
Figura 23 – Fração de volume disponível no <i>scaffold</i> ocupado por células e MEC .....	100
Figura 24 - Cinética de cultivo celular e variação do ciclo celular da população de células .	102
Figura 25 - Regra de decisão de avaliação e resposta ao ambiente considerando o pH.....	104
Figura 26 – Cinética do cultivo celular no modo estático utilizando o pH como critério de decisão da regra de avaliação do ambiente.....	105
Figura 27 - Cinética do cultivo celular no modo perfusão .....	106
Figura 28 - Cinética do cultivo celular no modo estático utilizando o pH como critério de decisão da regra de avaliação do ambiente sem <i>scaffold</i> (porosidade 100%). .....	108
Figura 29 – Velocidade média de deslocamento das células ao longo da simulação.....	110
Figura 30 - Taxa de crescimento específico no cultivo em perfusão .....	111
Figura 31 – Vista frontal superior dos agentes interagindo entre si e com a estrutura do <i>scaffold</i> durante períodos diferentes da simulação .....	114

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Variáveis de entrada na caracterização de <i>scaffold</i> .....	56
Tabela 2 - Regras de decisão das células.....	60
Tabela 3 - Valores dos níveis adotados para cada fator .....	68
Tabela 4 - Planejamento experimental para análise de componentes principais e seus efeitos	69
Tabela 5 - Valores das variáveis utilizados na avaliação do modelo .....	72
Tabela 6 – Comparação e análise de modelos baseado em agentes aplicados à cultura de células e de tecidos .....	127
Tabela 7 - Relação entre as variáveis, suas escalas e ordens de grandeza .....	133

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Apoptose celular: processo bioquímico que resulta, em última instância, na morte celular
ABM	<i>Agent Based Model</i> – Modelagem Baseada em Agentes
AC/CA	Autômatos celulares/ <i>Cellular Automaton</i>
Akt	<i>Protein kinase B</i> – Proteína quinase B
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosina trifosfato
BC	<i>Body-Centered Cube</i> – Estrutura cúbica com feixes diagonais em seu interior/centro
BMP	<i>Bone Morphogenic Protein</i> - proteínas morfogênicas ósseas
CAD	<i>Computer-Aided Design</i> – Desenho Assistido por Computador
CDRH	<i>Center for Devices and Radiological Health</i> – Centro de Saúde e Equipamentos Duriológicos
CFD	<i>Computational Fluid Dynamics</i> - Fluidodinâmica Computacional.
CHO	<i>Chinese Hamster Ovary cells</i> – Células do Ovário de Hâmster Chinês
CPM	<i>Cellular Potts Model</i> – Modelo de representação celular por cluster de pontos de um <i>lattice</i>
CPU	<i>Central Processing Unit</i> – Unidade Central de Processamento
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> – Ácido Desoxirribonucleico
EA	<i>Early apoptosis</i> – Apoptose precoce: estágio inicial do processo de apoptose, onde é observada a perda de potencial da membrana mitocondrial e translocação de fosfatidilserina da membrana para o meio extracelular
EMA	<i>European Medicines Agency</i> – Agência Européia de Medicamentos
ERK1	Proteína quinase ativada por mitógenos
EU	<i>European Union</i> – União Européia
EUA	Estados Unidos da América

Fas-L	Ligante Fas: uma proteína transmembranar tipo II que pertence à família de fatores de necrose tumoral
FD	<i>Face Diagonal Cube</i> – Estrutura cúbica com feixes diagonais nas faces
FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i> - fator de crescimento de fibroblasto
FX	<i>Face X Cube</i> – Estrutura cúbica com feixes em ambas as diagonais nas faces
FXBC	<i>Face X Body-Centered Cube</i> – Estrutura cúbica com feixes em ambas as diagonais nas faces e em seu interior/centro
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> – Agência reguladora de alimentos e medicamentos
FDM	<i>Fused Deposition Modeling</i> - Modelagem por Deposição de Material Fundido
FEM	<i>Finite Element Method</i> – Método dos Elementos Finitos
G0	Etapas do ciclo celular em que a célula se encontra em quiescência, desempenhando funções básicas
G1	Fase do ciclo celular em que a célula aumenta o seu volume pela cópia de organelas e produção de moléculas utilizadas na divisão celular
G2M	Período de transição entre a fase G2, onde ocorre a reorganização da célula para o início da mitose, e a mitose, propriamente dita, ou divisão celular
GAG	Glicosaminoglicanos
GPU	<i>Graphics Processing Unit</i> – Unidade de Processamento Gráfico
GUI	<i>Graphical User Interface</i> – Interface gráfica para usuário
HA	Hidroxiapatita porosa
hASC	<i>Human adipose-derived stem cells</i> - células-tronco derivadas de tecido adiposo humano
hBMSCs	<i>Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells</i> - células estaminais humanas derivadas de medula óssea
HUVECs	Células endoteliais da veia umbilical humana
IGF-1	<i>Insulin-like Growth Factor 1</i> - fator de crescimento similar a insulina 1

IP	<i>Informational Positioning model</i> - modelo Informação Posicional
LA	<i>Late apoptosis</i> – etapa do processo de apoptose onde é observada a desfragmentação do DNA da célula
LDH	Lactate dehydrogenase - Lactato desidrogenase
LINC	Ligante do Nucleosqueleto e do Citoesqueleto
MBA/ABM	Modelo Baseado em Agentes/ <i>Agent-Based Model</i>
MEC/ECM	Matriz Extracelular/ <i>Extra Cellular Matrix</i>
NHE1	Bomba de sódio e hidrogênio de eritrócito
PCA	<i>Principal Component Analysis</i> – Análise de Componente Principais
pCO <sub>2</sub>	Pressão parcial de dióxido de carbono
PDGF	<i>Platelet-derived Growth Factor</i> - fator de crescimento derivado de plaquetas
pH	Potencial hidrogeniônico
PHBHHx	Poli(3-hidroxi butirato-co-3-hidroxi hexanoato)
PI3K	<i>Phosphatidylinositol-3-OH kinase</i>
PIP2 e PIP3	<i>Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate</i> e <i>Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate</i>
PLC	Poly(-caprolactone)
PLCL	Poli(L-lactideo-co-ε-caprolactona)
PLCL-COLI	Poli(L-lactideo-co-ε-caprolactona) - Colágeno Tipo I
PMMA	Poli (metacrilato de metila)
pO <sub>2</sub>	Pressão parcial de oxigênio
R <sup>2</sup> <sub>adj</sub>	Coefficiente de determinação ajustado
RD	<i>Reaction-Difusion model</i> – Modelo de Reação-Difusão
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i> – Ácido Ribonucleico
RGD	Moléculas com a sequência arginina-glicina-asparagina
S	Fase do ciclo celular onde a célula duplica o seu matéria genético e os centrossomos
SFB/FCS	Soro Fetal Bovino/ <i>Foetal Calf Serum</i>
SLA	<i>Stereolithography</i> - Estereolitografia
SLS	<i>Selective Laser Sintering</i> – Sinterização Seletiva Lazer

TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i> - Fator de necrose tumoral
TGF $\beta$	<i>Transforming Growth Factor <math>\beta</math></i> - fator de crescimento transformante $\beta$
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> - fator de crescimento endotelial vascular



## LISTA DE SÍMBOLOS

$A$	Número de coordenadas x,y,z as quais é atribuído o valor 1
$a$	Área da célula unitária 2D, ou de cada face do voxel (célula unitária 3D) = $d^2$
$B$	Número de amostragens na recorrência do <i>bootstrapping</i>
$C$	Constante de proporcionalidade específica do material do <i>scaffold</i> na correlação do módulo de elasticidade com a porosidade
$\zeta$	Complexidade energética
$\zeta_{Max}$	Complexidade energética máxima
$\zeta_{Média}$	Complexidade energética média máxima
$d$	Comprimento de um dos lados do voxel (cubo)
$\Delta pH$	Variação de pH
$E^*$	Módulo de elasticidade efetivo do <i>scaffold</i>
$E_s$	Módulo de elasticidade do material sólido
$i$	Unidade de célula/coordenada/voxel de valor igual a 0
$k$	Permeabilidade
$K$	Coefficiente de proporcionalidade empírico da relação de Kozeny–Carmen
$L$	Comprimento do <i>lattice</i>
$Max$	Função que encontra o maior valor de uma lista
$n$	Número total de “0” dentro do bloco amostrado do <i>scaffold</i>
$\dot{n}$	Taxa de alimentação ou vazão molar (número de moléculas/ $t_m$ )
$\eta$	Constante de potência específica do material do <i>scaffold</i> na correlação do módulo de elasticidade com a porosidade
$P$	Porosidade
$p$	Posição do agente específico em seu respectivo conjunto (lista) de agentes
$S$	Área total da superfície dos poros
$t_m$	Unidade de tempo característico da escala molecular

$t_n$	Unidade de tempo característico da escala celular
$t_{n-total}$	Tempo total de cultivo
$t_{Max}$	Tempo em que ocorreu a maior ocupação do espaço vazio por célula ou MEC
$x_3$	Lista de posições do espaço tridimensional do <i>scaffold</i>
$u_{m,j}$	Velocidade da molécula $m$ no tempo $j$ , correspondente ao número de voxels ascendido pela molécula durante o período $j$ .
$u_{média,m,tm}$	Velocidade média de cada molécula
$V$	Volume do bloco amostrado no <i>bootstrapping</i>
$v$	Volume do voxel cúbico = $d^3$
$x_b, y_b, z_b$	Tamanho das coordenadas x, y e z em cada amostragem do <i>bootstrapping</i>
$x_{max}, y_{max}, z_{max}$	Comprimento, largura e altura do <i>scaffold</i>
$\Delta z$	Unidade discreta de altura ou intervalo em $z$

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	15
2	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	18
2.1	CIÊNCIA DOS SISTEMAS COMPLEXOS .....	18
2.2	CÉLULAS E TECIDOS COMO SISTEMAS COMPLEXOS .....	20
2.2.1	<b>A complexidade nos fundamentos da biologia celular e cultura de células</b> .....	23
2.2.2	<b>Cultura de células 2D x 3D e a engenharia de tecidos</b> .....	25
2.2.2.1	<b>Aspectos econômicos da engenharia de tecidos</b> .....	30
2.3	MODELAGEM DE SISTEMAS COMPLEXOS .....	33
2.4	MODELAGEM DE CULTURA DE CÉLULAS 2D, 3D E DE TECIDOS .....	36
2.4.1	<b>Design e modelagem de <i>Scaffolds</i> para aplicação em (simulação de) cultivo de tecidos</b> .....	41
2.5	MODELAGEM BASEADA EM AGENTES E AUTÔMATOS CELULARES NA CULTURA DE CÉLULAS E DE TECIDOS .....	47
3	<b>OBJETIVO GERAL</b> .....	51
3.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	51
4	<b>MÉTODOS</b> .....	52
4.1	ALGORITMO DE CONSTRUÇÃO E AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES DO SCAFFOLD TRIDIMENSIONAL .....	53
4.2	ALGORITMO DE CONSTRUÇÃO DOS AGENTES E SUAS REGRAS DE COMPORTAMENTO .....	58
4.2.1	<b>Regras de comportamento das células</b> .....	60
4.2.1.1	<b>Nutrição</b> .....	61
4.2.1.2	<b>Migração celular</b> .....	65
4.2.1.3	<b>Avaliação e resposta às condições do microambiente</b> .....	66
4.2.1.4	<b>Morte celular</b> .....	68
4.3	AVALIAÇÃO DO MODELO .....	68
4.3.1	<b>Avaliação dos principais efeitos e componentes do modelo</b> .....	68
4.3.2	<b>Avaliação da reprodução do comportamento de sistemas biológicos <i>in vitro</i></b> .....	71
4.4	ANÁLISE ESTATÍSTICAS .....	74

5	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	76
5.1	CARACTERIZAÇÃO DO SCAFFOLD .....	76
5.2	ANÁLISE DOS PRINCIPAIS EFEITOS E COMPONENTES .....	90
5.3	AVALIAÇÃO DA REPRODUÇÃO DO COMPORTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS <i>IN VITRO</i> .....	99
6	<b>CONCLUSÃO</b> .....	115
	REFERÊNCIAS .....	116

## 1 INTRODUÇÃO

O cultivo de células de mamíferos *in vitro* data do fim do século dezenove, tendo se desenvolvido enormemente desde então, da criação de protocolos de cultivo, técnicas assépticas, meios de cultura específicos a recipientes para cultivo celular (biorreatores). Paralelamente, o conhecimento adquirido acerca da biologia molecular, no campo da genômica, proteômica e metabolômica, contribuiu enormemente para o entendimento das interações entre células e das células com o meio extracelular, assim como das suas repercussões no ciclo de vida da célula e na formação de tecidos (RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ *et al.*, 2014).

Tal conhecimento tem sido imprescindível para compreender fenômenos emergentes observados em cultura de células, como a diferenciação e agregação celular - os quais estão relacionados a interações moleculares entre glicoproteínas de membrana e moléculas da matriz extracelular (MEC), constituindo diferentes formas de sinalização - ou até a perda do tecido, devido à indução generalizada de apoptose nas células (GLEN; KEMP; VOIT, 2019; MA'AYAN, 2017; PEREIRA *et al.*, 2016). Tais interações moleculares, tanto em nível citoplasmático quanto em nível extracelular, fazem com que a célula seja um sistema complexo em si, apresentando características observadas em outros sistemas complexos, tais como, evolução, auto-organização e reparo, emergência, reprodução e não linearidade (MA'AYAN, 2017).

As células, interagindo entre si e com o meio, atuam como agentes complexos e constroem as características de comportamento do sistema celular, o qual define uma outra ordem de complexidade. No caso do cultivo de células aderentes as interações célula-célula são intensificadas, gerando respostas não lineares aos estímulos do meio e um comportamento dinâmico do tecido formado. Na engenharia de tecidos, por exemplo, as condições de inoculação das células no *scaffold* impactam não só o tempo de desenvolvimento do tecido (o qual não segue uma relação linear com o número de células inoculadas), mas todo o desenvolvimento morfogênético e as características do tecido (CHUNG *et al.*, 2010; GLEN; KEMP; VOIT, 2019; SUN *et al.*, 2008).

Além disso, dadas as peculiaridades do comportamento de células aderentes e suas interações com o *scaffold* e moléculas do meio extracelular, o efeito de parâmetros de processo, tais como velocidade de perfusão do meio de cultura, distribuição da densidade de inóculo, pode não ser trivial (OLIVARES; LACROIX, 2012).

Embora tais fatos sejam conhecidos na literatura das ciências biológicas, os modelos matemáticos tradicionalmente desenvolvidos para representar o comportamento celular – cuja

importância reside tanto no suporte à compreensão dos fenômenos biológicos naturais quanto na identificação de condições ótimas do cultivo celular em ambientes controlados para aplicações nas áreas farmacêutica e biomédica, por exemplo - geralmente não abarcam tais características e peculiaridades. A utilização de modelos cinéticos como o de Monod e seus variantes, os quais utilizam taxas de crescimento e morte, bem como dados de rendimento célula-substrato constantes, possui limitações na predição do comportamento celular em circunstâncias não ideais do cultivo, tais como transferência heterogênea de nutrientes e oxigênio e alterações das condições de cultivo (CHARLEBOIS; BALÁZSI, 2018).

Nesse sentido, abordagens que possibilitam e viabilizam uma modelagem que traduz melhor a complexidade dos sistemas biológicos, tais como a Modelagem Baseada em Agentes (ABM), são de grande valia para a área. Bayrak e colaboradores (2015), por exemplo, utilizaram uma abordagem híbrida de modelagem baseada em agentes com análise baseada em fluxo dinâmico para simular (na plataforma Java) uma cultura de células de mamífero (Chinese Hamster Ovary cells – CHO) em batelada alimentada.

Neste trabalho, cada célula contida no reator foi considerada um agente, o qual é capaz de perceber as condições do meio e responder metabolicamente a tais condições. Os agentes utilizam glicose ou lactato como fonte de carbono para suas demandas energéticas, e mantêm-se em diferentes fases do ciclo celular (G0, G1, S, G2M e apoptose), tendo cada uma dessas fases, tempos específicos de completude. Experimentos *in silico* foram realizados de modo a representar as condições dos experimentos executados *in vitro*, durante o cultivo de células CHO em biorreator. Os resultados obtidos por meio das simulações apresentaram forte correlação com os dados experimentais, em ambas as condições iniciais testadas (alta e baixa densidade celular) (BAYRAK *et al.*, 2015).

Tanto a cultura de células 3D quanto a ciência dos sistemas complexos são áreas de estudo relativamente recentes, formalmente iniciadas em torno da segunda metade do século XX (PEREIRA *et al.*, 2016; WATERLOO INSTITUTE FOR COMPLEXITY & INNOVATION, 2019), sendo que ambas se encontram em pleno desenvolvimento, principalmente graças ao avanço tecnológico nos diversos seguimentos da ciência (MA'AYAN, 2017; LANGHANS, 2018).

Não obstante, a intersecção entre essas duas áreas ainda é incipiente, a despeito dos potenciais benefícios da aplicação de técnicas matemáticas e computacionais de análise de sistemas complexos na cultura de células 3D e suas aplicações (tais como a engenharia de tecidos). Pode-se citar, como possíveis resultados da interação mutualística entre as duas áreas, a redução de experimentos, superação de limitações tecnológicas, predição de condições ideais

de cultivo e o crescimento da biologia sistêmica (NURSE; HAYLES, 2011). Ainda assim, pode-se perceber na literatura relacionada, um discreto emprego da modelagem baseada em agentes como recurso para auxiliar o entendimento de sistemas celulares por meio da perspectiva da biologia de sistemas (KAUL; VENTIKOS, 2013).

Dessa forma, o presente trabalho se propõe a avaliar a modelagem baseada em agentes como uma opção viável de experimentos *in silico* de cultura de células 3D por meio de 1) exposições de conceitos comuns e divergentes entre as duas áreas, ao longo da revisão da literatura sobre sistemas complexos, cultura de células 3D e engenharia de tecidos, 2) reflexões sobre as principais limitações epistemológicas da convergência das duas áreas em trabalhos descritos na literatura, 3) desenvolvimento de um modelo baseado em agentes genérico na linguagem de programação Python, que mimetize uma cultura de células aderentes em meio poroso tridimensional, 4) adequação do modelo baseado em agente para aplicação específica em engenharia de tecidos.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 CIÊNCIA DOS SISTEMAS COMPLEXOS

Várias definições - ou aproximações da síntese do significado - de sistemas complexos podem ser encontradas na literatura. De um modo geral, pode-se dizer que um sistema complexo é um conjunto de componentes, elementos, agentes ou entidades que se relacionam e interagem entre si, de modo que o resultado coletivo dessas interações não corresponde exatamente à soma das ações individuais de cada componente/agente (MITCHELL; NEWMAN, 2001; SIEGENFELD; BAR-YAM, 2020).

Baseado nessa concepção do objeto de estudo (sistema complexo), é possível perceber que, diferentemente das demais abordagens científicas de análise tradicionalmente conhecidas, onde as partes são descritas como objetos homogêneos e seus comportamentos são extrapolados para comportamento do sistema, a ciência dos sistemas complexos busca compreender as relações estabelecidas entre os agentes e como elas resultam em fenômenos emergentes a nível coletivo (SIEGENFELD; BAR-YAM, 2020). Fenômenos emergentes são, portanto, comportamentos coletivos singulares que não são iguais à mera soma das ações individuais dos agentes.

A complexidade de um sistema está relacionada ao número de estados/configurações possíveis existentes em uma determinada escala (SIEGENFELD; BAR-YAM, 2020), o que permite, em última instância, quantificar a complexidade total como o estado de transferência de energia envolvida em funções do sistema, entre os agentes/elementos, de maior probabilidade de ocorrência (CLARK; JACQUES, 2012). Portanto, sistemas observados de escalas diferentes podem resultar em complexidades diversas, não só pelas diferenças nas interações entre seus elementos, mas também devido a sua escala, a qual diz respeito à função do sistema estudado.

Oltvai e Barabási (2002), por exemplo, propõem uma síntese da organização da complexidade celular em uma pirâmide de complexidade da vida, baseado em trabalhos de mapeamento de rede de motivos e de regulação transcricional em *Escherichia coli* e *Saccharomyces cerevisiae* (MILO *et al.*, 2002; LEE *et al.*, 2002). A base da pirâmide representa os fundamentos da organização funcional da célula: genoma, transcriptoma, proteoma e metaboloma.

Cada um desses componentes organizados (que em nível mais elementar são formados por diversos outros componentes – p. ex., moléculas - e possuem suas próprias complexidades) interagem entre si continuamente e de forma preferencial (conexões funcionais) formando



motivos genético-regulatórios ou vias metabólicas, que por sua vez são os blocos construtores dos módulos funcionais das células. Esses módulos estão aninhados, gerando uma arquitetura hierárquica livre de escala (topo da pirâmide). Embora os componentes individuais (genoma, metaboloma etc.) sejam específicos, é possível perceber uma recorrência e similaridade da topologia das redes celulares com redes naturais, sociais e até a World Wide Web (OLTVAI; BARABÁSI, 2002).

A proposição da pirâmide de complexidade da vida, descrita acima, ilustra bem os objetos de estudo e métodos de análise da ciência dos sistemas complexos. O desenvolvimento dessa ciência tem possibilitado identificação de estruturas e características compartilhadas por diversos sistemas complexos, o que pode oferecer à sociedade novas formas de compreensão dos sistemas e resolução de problemas complexos (JACOBSON, 2000). Algumas características comumente encontradas em sistemas complexos são (LADYMAN; LAMBERT; WIESNER, 2013; MITCHELL; NEWMAN, 2001):

- Emergência: conforme descrito anteriormente, essa característica está relacionada ao surgimento de comportamento na macroesfera como resultado do agregamento dos elementos do sistema, e que não representa a mera soma das ações das partes.
- Compartimentalização, hierarquia e auto-organização: compartimentalizações ou subdivisões de agentes/elementos por funções são comumente encontrados em sistemas complexos (p. ex., compartimentalizações por organelas, em células), embora isso não signifique separação das partes. Tais compartimentos trocam informações, formando redes e hierarquias de funções. Entretanto, a estrutura hierárquica se forma de maneira espontânea, sem um elemento controlador, gerando um estado auto-organizado ou coordenado das ações dos elementos.
- Retroalimentação: em vários sistemas, a ação dos agentes no próximo período observado depende das ações tomadas pelos agentes no período atual. Este é um mecanismo bastante recorrente para correção de falhas, organização coletiva e aprendizado, como pode ser percebido em vários algoritmos de inteligência artificial.
- Aprendizado e evolução: aprendizado, no contexto da ciência de sistemas complexos, corresponde à capacidade do sistema em reter informações que favorece a sua adaptação e em última instância, resulta em sua evolução.
- Não linearidade: embora a existência de não linearidade não seja um requisito para que o sistema seja complexo, muitos sistemas complexos apresentam comportamento não linear,

ou seja: a variação dos estados dos agentes não resulta em uma resposta proporcional na macroesfera.

Dado o presente exposto, abaixo são apresentadas características das célula e tecidos que possibilitam a organização desses elementos (ou sistemas) para a realização de funções necessárias na interação com outros sistemas. Espera-se com os próximos itens evidenciar o porquê das células e tecidos serem considerados sistemas complexos.

## 2.2 CÉLULAS E TECIDOS COMO SISTEMAS COMPLEXOS

Segundo Ma'ayan (2017), as células humanas podem ser consideradas agentes complexos situados em sistemas também complexos, o que revela diferentes níveis de complexidade do sistema biológico. Em nível intracelular, as células são compostas de várias cópias de diferentes unidades (enzimas, DNA, RNA, organelas, dentre outras), que interagem entre si, formando uma entidade funcional de ordem maior (célula).

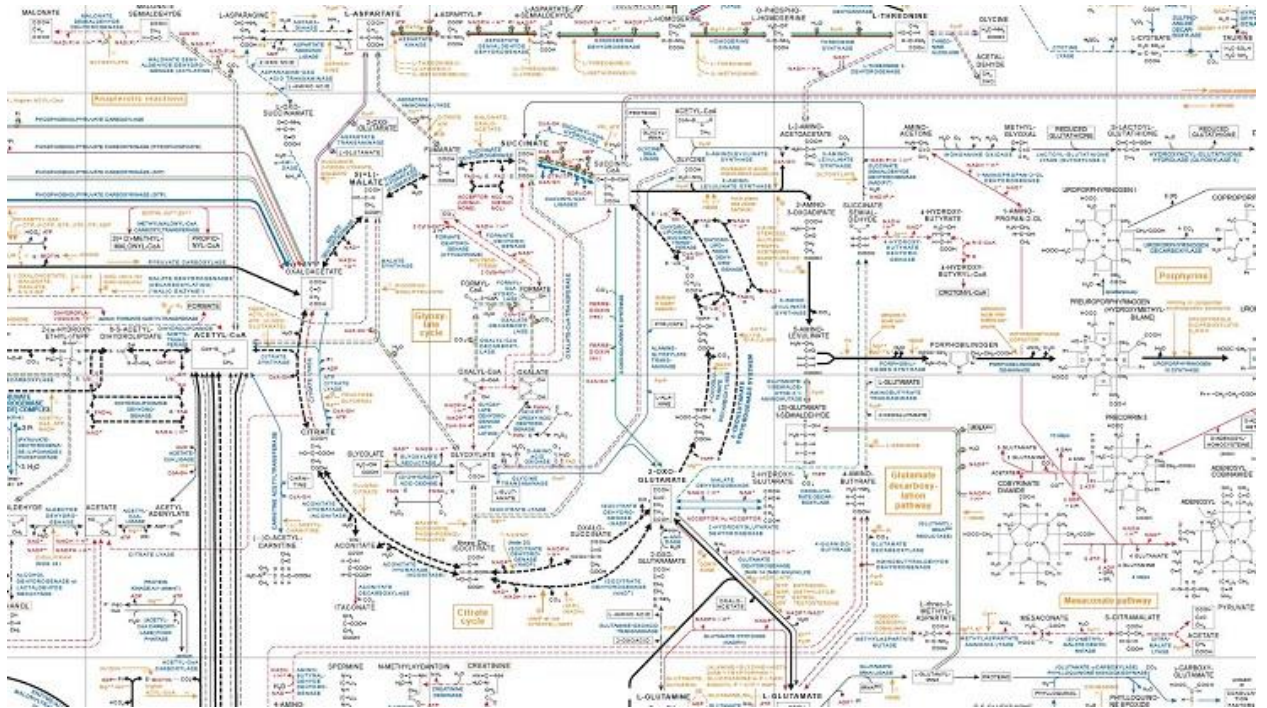
Esta, por meio de processos de evolução ao longo do tempo, desenvolveu formas de expressar regiões específicas de um código praticamente comum (DNA) de acordo com os estímulos recebidos do meio. Essa comunicação (célula-célula, célula-MEC, célula-sinal) geralmente desencadeia uma cascata de reações não lineares, resultando muitas vezes, em respostas caóticas (MA'AYAN, 2017).

Este é o caso, por exemplo, da ativação das caspases a partir da alteração da conformação de receptores, como o CD4, ao se ligar a uma molécula sinalizadora de morte. Tal ligação resulta, em última instância, na apoptose, ou morte celular. Assim como a via das caspases, diversas vias metabólicas são atualmente conhecidas, desde o catabolismo da glicose à expressão de genes específicos de acordo com os estímulos externos (XU; SHI, 2007). A Figura 1 exemplifica as interrelações entre as vias metabólicas celulares que contribuem para as características de complexidade da célula em nível intracelular.

Um outro exemplo de via de sinalização é a da fosfatidilinositol 3'-OH quinase - (PI3K) -Akt. Essa via constitui uma rede de moléculas proteicas e não proteicas que, interagindo entre si, regulam a proliferação, sobrevivência, crescimento e mobilidade celular. A molécula PI3K é uma proteína heterodimérica que se liga ao receptor tirosina quinase de fator de crescimento celular. Quando essa via é acionada, a PI3K catalisa a conversão de fosfoinositol 4,5-bifosfato (PIP2) em fosfoinositol 3,4,5-trifosfato (PIP3). O acúmulo de PIP3 promove um sítio de ancoragem para o Akt na membrana plasmática; quando essas moléculas se ligam, uma alteração da conformação nativa da Akt expõe regiões críticas para a fosforilação de diversas

quinases, as quais, em última instância, bloqueiam a função de proteínas que induzem a expressão de genes relacionados a apoptose celular (SHANKAR *et al.*, 2019).

Figura 1 - Mapa aumentado das principais vias metabólicas humanas focalizado no ciclo de Krebs.



Fonte: ROCHE, 2021.

A via PI3K é regulada pela enzima lipídeo fosfatase do gene PTEN, a qual desfosforila a PIP3 a PIP2; quando a proteína está ausente ou mutada (o que acontece em células cancerígenas) a ativação da via PI3K promove a sobrevivência, proliferação e movimentação da célula tumoral (SHANKAR *et al.*, 2019).

O exemplo dessa via de sinalização - que interage também com outras vias, tais como a NF- $\kappa$ B (SHANKAR *et al.*, 2019) - demonstra com clareza a natureza complexa do nível molecular das células, onde ocorrem diversas reações em escala não linear, regulações por produto de reação (feedback), mutações que favorecem a sobrevivência de células (neste exemplo, células cancerígenas) e emergência de comportamentos celulares por meio de interação simples de várias moléculas.

Além disso, algumas capacidades fundamentais das células (deslocamento, envelhecimento de proteínas, morfogênese de tecidos) podem ser compreendidas por meio da biofísica como fenômenos mecânicos por natureza. Sob essa perspectiva (mecanobiologia), na qual tais capacidades são estudadas como convoluções mecânicas temporais e espaciais do

complexo biológico em várias escalas, uma rede/circuito de comunicação celular direciona diferentes comportamentos da célula (MAK, 2015).

O ancoramento das células à matriz extracelular e a outras células por exemplo, por meio do complexo LINC (ligante do nucleosqueleto e do citoesqueleto) e moléculas de adesão, promove um circuito de transdução mecânica que promove a comunicação do meio externo com o intracelular, por intermédio das moléculas do citoesqueleto; essa conexão se estende até o núcleo e resulta em expressão de genes específicos, de acordo com os estímulos mecânicos externos. Na escala de tecido, na qual as células encontram-se ancoradas à MEC e umas às outras de forma auto-organizada, forma-se uma rede complexa de comunicação mecânica (além das comunicações químicas) que resulta em um comportamento coletivo das células como tecido (MAK, 2015).

Do mesmo modo, em nível de tecido, uma rede de comunicação celular é estabelecida por meio da secreção de substâncias sinalizadoras na MEC, promovendo as comunicações parácrina, autócrina ou sináptica; essas por outro lado são mais afetadas por variáveis do meio externo, tais como a difusividade de tais moléculas através de barreiras biológicas (NATURE EDUCATION, 2014; BRITISH SOCIETY FOR CELL BIOLOGY, 2008).

A complexidade dos tecidos varia com as características do tecido – por exemplo, se o sistema possui diferentes tipos de células especializadas – e a formação de estruturas de função direcionada, como órgãos. Tal complexidade é tão vital ao ponto da sua reprodução no desenvolvimento de tecidos engenheirados ser determinante para o sucesso do transplante e da regeneração da perda tecidual em pacientes (IKADA, 2006), bem como para o entendimento de doenças como o câncer e para o desenvolvimento de tratamentos para elas (BREGENZER, 2019).

Bregenzler e colaboradores (2019), por exemplo, demonstram a importância da análise de tumores sob a perspectiva sistêmica, na qual as células tumorais se desenvolvem em uma estrutura tridimensional, envolvidas por células e tecidos do entorno, respondendo a estímulos mecânicos (compressão, tensão e cisalhamento, forças viscoelásticas) e químicos (sinalização autócrina, endócrina e parácrina). As células tumorais também estabelecem ligações célula-célula com células especializadas não cancerígenas e célula-MEC; todos esses estímulos corroboram para o deslocamento e proliferação das células cancerígenas, podendo ser determinante na invasão de outros tecidos.

### 2.2.1 A complexidade nos fundamentos da biologia celular e cultura de células

Uma vez ilustrada a complexidade de células e tecidos por meio de algumas das suas vias metabólicas, mecanismos de sinalização celular e motivos regulatórios, é preciso compreender como os elementos dessas estruturas interagem entre si, fazendo emergir hierarquias de redes de módulos funcionais e comportamentos coletivos de células entre tecidos. Neste tópico, não se pretende exaurir o tema, dada a extensa literatura relacionada, mas sim proporcionar as bases teóricas de compreensão do comportamento de células aderentes que fundamentam as regras de decisão dos agentes do modelo desenvolvido no presente trabalho.

Células aderentes que tenham sido isoladas de seu tecido original, quando são acondicionadas em materiais com superfícies que possibilitam a formação de pontos focais – com microporos e rugosidade adequados, por exemplo - ou a ligação de componentes da matriz extracelular (tais como colágeno, fibronectina e laminina), se ancoram à superfície por meio de proteínas de membranas, promovendo sinalizações intracelulares. Algumas células podem requerer ligações célula-célula para se desenvolverem ou essas ligações são feitas para promover sinalização celular, como no caso da inibição por contato. Essas ligações são geralmente feitas por meio de caderinas ou moléculas de adesão cálcio independentes (FRESHNEY, 2005).

Tão logo as células estabelecem pontos focais (no caso de cultura de tecidos e de cultura de células 3D, as ligações são estabelecidas em 3 dimensões), células produtoras de matriz extracelular secretam glicoproteínas e outras macromoléculas que constituem a matriz extracelular (MEC), tais como colágeno, laminina, fibronectina, hialuronana, proteoglicanos, fatores de crescimento e/ou citocinas, além de enzimas (em alguns casos) responsáveis pela degradação e remodelagem da matriz extracelular. Assim, tanto as células moldam a matriz com a qual interagem, quanto são afetadas por ela, resultando em diferenciação de algumas células e manutenção/alteração de seus fenótipos (RINGER *et al.*, 2017; JORGENSEN *et al.*, 2020).

A interação das células com a MEC por meio de integrinas pode ter como consequência a sinalização celular e alteração do citoesqueleto. As integrinas encontram-se conectadas a filamentos de actina, que por sua vez se conectam ao núcleo e a várias organelas junto aos microtubulos, promovendo juntos a sustentação e locomoção das célula. A depender da sinalização recebida e da reação desencadeada, *lamelipodiums* são formados pelas reações de polimerização de g-actina em f-actina, dando origem a polarização da célula, etapa esta fundamental para a o deslocamento da célula. Vários fatores de crescimento são reconhecidos

por gerarem sinais para migração celular (FRESHNEY, 2005; HARPER; LI *et al.*, 2019; MAYOR; ETIENNE-MANNEVILLE, 2016), o que justifica seus constantes usos na cultura de células e tecidos.

As moléculas de actina e os microtúbulos também estão envolvidas na organização do espaço citoplasmático ao longo do ciclo celular. A depender das condições do ambiente, da energia armazenada e dos estímulos recebidos, a célula inicia o processo de divisão celular entrando na fase G1, onde está suscetível a estímulos que a levarão a dar continuidade no processo de biossíntese, se manter em estado quiescente (G0), ou se diferenciar. No primeiro caso, a fase G1 é sucedida pela fase S, onde ocorre a replicação do DNA da célula. Em seguida, a célula atinge a fase G2 onde fica novamente suscetível a regulações e faz reparos no DNA, se necessário, ou entra em apoptose. Caso o ciclo celular seja continuado, a célula entra em mitose e se divide, compartilhando o material genético e organelas anteriormente duplicados com a célula filha (FRESHNEY, 2005; HARPER; BROOKS, 2005).

A maior parte das ações das células são mediadas pela conversão de ATP em ADP, o que implica na limitação de certas ações (como a migração celular, por exemplo) pela disponibilidade de energia da célula. O ATP é obtido pelas células por meio do catabolismo de moléculas orgânicas, geralmente glicose – embora lactato, aminoácidos e lipídios possam ser catabolizados para geração de ATP. Diversos estudos têm demonstrado que o lactato é gerado ao fim da glicólise e que essa molécula possui papel importante na etapa posterior de forforilação oxidativa, sendo uma rápida fonte de energia em células sujeitas a picos de demanda energética quando há baixa disponibilidade de glicose, como no caso de células musculares durante atividade física e células cancerígenas em rápida proliferação (FRESHNEY, 2005; KANE, 2014; RABINOWITZ; ENERBÄCK, 2020).

Caso a glicose seja completamente oxidada a CO<sub>2</sub> e água, aproximadamente 36 a 38 ATP são gerados por molécula de glicose, fornecendo energia para as funções celulares (FRESHNEY, 2005; KANE, 2014; RABINOWITZ; ENERBÄCK, 2020). Moléculas de lactato também resultam da glicólise, devido à redução do piruvato a lactato para regenerar NAD<sup>+</sup> a partir do NADH citosólico por meio da enzima lactato desidrogenase (LDH), sendo que acúmulos de lactato são observados quando há intenso fluxo de glicólise (PARK *et al.*, 2018; LOCASALE; CANTLEY, 2011). Embora o lactato possa ser catabolizado para geração de energia, o seu acúmulo durante a glicólise, conhecido como efeito Warburg, resulta na acidificação do microambiente extracelular e do citosol (dependendo da atividade dos transportadores de monocarboxilato e quantidade de lactato produzido), devido à liberação concomitante de íons hidrônio. A acidificação dos meios intra e extracelular podem ocasionar

ou favorecer a inibição de enzimas, desbalanceamento de potencial de membranas e desrupção da membrana celular (PARK *et al.*, 2018; LOCASALE; CANTLEY, 2011).

### 2.2.2 Cultura de células 2D x 3D e a engenharia de tecidos

Desde a metade do século vinte, cientistas vêm demonstrando o comportamento diferenciado da cultura de células em superfície bidimensional e em ambiente tridimensional, motivados pela constatação de mudanças no comportamento de células quando cultivadas em placas – aquisição de formato achatado, divisão aberrante, perda do fenótipo diferenciado (BAKER; CHEN, 2012). Tais comportamentos variam de expressões morfológicas e gênicas entre células de mesma linhagem à diferenciação celular; alguns dos argumentos que suportam a relevância da cultura de células 3D em detrimento da 2D são descritas a seguir.

Na cultura de células 3D, o citoesqueleto encontra-se em configuração expandida nas três dimensões – ao invés de distribuído de forma plana; nesse modo de cultivo, as células possuem maior mobilidade e secretam mais componentes da MEC (PEREIRA *et al.*, 2016). Além disso, o aumento da superfície de contato da célula permite a ela captar e responder a estímulos do meio, realizar maiores números de comunicação célula-célula (como inibição por contato, por exemplo), comunicações parácrinas (uma vez que o arcabouço tridimensional propicia melhor alcance de moléculas sinalizadoras às células do entorno – embora dificulte o deslocamento dessas molécula -, ao mesmo tempo que concentra essas moléculas em microambientes) e interação célula-MEC. Na cultura de células 3D, também é possível simular (*in vitro*) a hipóxia, alterações do ciclo celular, proliferação e ação de medicamentos em tumores (KAPAŁCZYŃSKA, 2018) geralmente observados *in vivo*.

Mais recentemente, estudos comparativos entre cultura de células 2D e 3D têm demonstrado que a segunda técnica possui inúmeras vantagens sobre a primeira, mostrando ser um modelo mais aproximado da organização tecidual biológica. Diferentes resultados foram encontrados por D’Aiuto e colaboradores (2018), por exemplo: a maior concentração inibitória da infecção de 50% (IC50) das células neuronais por herpesvírus (do medicamento aciclovir) foi de 0,5  $\mu\text{M}$  em culturas de células neuronais em 2D e de 3,1  $\mu\text{M}$  em culturas em 3D, o que demonstra como a formação de múltiplas camadas de células e de MEC, bem como o aumento de sua área de superfície, alteram parâmetros farmacocinéticos de medicamentos no tratamento de infecções.

Em co-culturas de fibroblastos mesenquimais com células de câncer epitelial, essas células não só tiveram suas morfologias modificadas (comparado com co-culturas em 2D),

como as células cancerígenas formaram estruturas tridimensionais, enquanto as células de fibroblastos circundaram as cancerígenas, agindo como células de assistência (KAPALCZYŃSKA, 2018). Todos esses fatos têm promovido um estímulo da comunidade científica a desenvolver protocolos de cultivos, reatores e métodos de análises de cultura de células 3D (PROMOCELL, 2019).

Além das aplicações da cultura de células 3D como plataforma de desenvolvimento de novos fármacos e na compreensão do desenvolvimento de tumores, suas interações com tecidos e órgãos e sua eliminação por diversas estratégias terapêuticas, essa nova tecnologia fomenta o desenvolvimento da engenharia de tecidos.

Esse campo de pesquisa aplica conhecimento e tecnologias de biologia celular e molecular, ciências de materiais e fenômenos de transporte (dentre outros saberes científicos) para cultivar tecidos e órgãos em reatores. Em um conceito mais abrangente, utilizado tanto por Kim e colaboradores (2018), quanto por Langer e Vacanti (1993), a engenharia de tecidos é o ponto de convergência entre a biologia e a engenharia para promover o desenvolvimento, melhoria ou recuperação de funções teciduais.

Dentre os tecidos mais estudados no desenvolvimento de tecnologias na engenharia de tecidos, encontram-se ossos, cartilagens, peles, córnea, ligamento, células embrionárias, tendão e válvulas cardíacas cultivadas *in vitro* e aprovados por diferentes órgãos regulatórios para transplante e medicina regenerativa em diversos países (ALIANCE FOR REGENERATIVE MEDICINE, 2019).

O transplante de pele cultivada *in vitro*, por exemplo, para pacientes com úlcera de pele causada por diabetes, tem apresentado grande sucesso enquanto tratamento para esses ferimentos. Em um desses produtos, fibroblastos dérmicos neonatais são isolados de uma região saudável do paciente e cultivados em um *scaffold* de poli(lactato-co-glicolato). As células são cultivadas em biorreator customizado até a formação de um tecido similar à camada dérmica interna da pele (GRIFFITH, NAUGHTON, 2002).

Um outro tecido engenheirado também aprovado pelo órgão *Food and Drug Administration* (FDA) é composto por uma camada de fibroblastos dérmicos suspensos em solução de colágeno (arcabouço que representa a MEC) coberta por várias camadas de queratinócitos. Após transplantados, estes tecidos secretam componentes da matriz extracelular e passam a se comunicar com as células do entorno por meio de moléculas sinalizadoras, promovendo a integração entre os tecidos (GRIFFITH, NAUGHTON, 2002; LIEN; KO; HUANG, 2009; JORGENSEN *et al.*, 2020; CHANTRE *et al.*, 2019; RINGER *et al.*, 2017).



A produção *in vitro* de tecidos está intrinsecamente relacionada ao cultivo de células 3D e a auto-organização complexa das células. Nessa tecnologia, o *scaffold* – o qual pode ser fabricado a partir de polímeros sintéticos, como poliglicolato e polilactato, ou a partir de polímeros naturais, tais como colágeno e fibrina – possui papel fundamental no sistema. Além de proporcionar a sustentação das células em três dimensões, essa estrutura orienta as células durante seu deslocamento e pode ser construído de modo a melhorar o transporte de nutrientes oxigênio e impulsionar a angiogênese, crescimento ou diferenciação do tecido (GRIFFITH; NAUGHTON, 2002; JORGENSEN *et al.*, 2020; CHANTRE *et al.*, 2019; RINGER *et al.*, 2017).

É desejado que o arcabouço seja biocompatível e biodegradável e, a partir de tecnologias moleculares e robóticas – tal como a impressão 3D – o *scaffold* pode ser construído com as características (rigidez, porosidade, degradabilidade, presença de hormônios de crescimento e de diferenciação em sua constituição) e formato necessários para o desenvolvimento do tecido ou órgão desejado (DUVAL *et al.*, 2017; GRIFFITH; NAUGHTON, 2002).

Nesse aspecto, a ciência de materiais possui importantes contribuições para o desenvolvimento da engenharia de tecidos, tanto pelo conhecimento das propriedades químicas e biológicas dos materiais utilizados nos tecidos engenheirados, quanto pela aplicação de técnicas de avaliação das propriedades mecânicas dos *scaffolds*. Para que o tecido fabricado possa ser posteriormente utilizado no tratamento de lesões teciduais, por exemplo, é essencial que ele ofereça a porosidade necessária para a migração e proliferação de células, difusão de nutrientes e vascularização, bem como resistência adequada à carga e tipo de força de cisalhamento aos quais aquele tipo de tecido geralmente está exposto (SCAGLIONE *et al.*, 2014).

Koh e colaboradores (2019), por exemplo, demonstraram a importância da análise cuidadosa da aplicação do tecido (tanto do ponto de vista do local de aplicação, quanto das características do paciente) na modelagem e fabricação do *scaffold*. Os autores determinaram as propriedades ideais do *scaffold* a ser utilizado na regeneração de cartilagem do joelho utilizando a teoria de mecano-regulação e um modelo de elementos finitos que simulou a diferenciação celular ocasionada por ciclos de tensão na cartilagem (aplicação de carga axial de 800N por 0,5 segundo), mimetizando uma caminhada. O módulo de elasticidade do tecido simulado foi calculado correlacionando-se o módulo de Young do dos tecidos diferenciados, concentração e fração volumétrica das células em cada nó da malha do método de elementos finitos.

O contato foi modelado entre a cartilagem femoral e o menisco, menisco e cartilagem tibial, cartilagem femoral e cartilagem tibial para lados medial e lateral, resultando em um total de seis pares de contatos, sendo que a solução das equações pelo método dos elementos finitos foi feita por meio do software ABAQUS 6.5; os cálculos da teoria de mecano-regulação foram feitos por meio de uma subrotina definida pelo usuário, construída usando um código em FORTRAN, e a determinação dos parâmetros do *scaffold* otimizado foi feita no software Isight. Os resultados da simulação se mostraram muito próximos dos resultados experimentais além de terem comprovado a importância da presença do *scaffold* com propriedades otimizadas para o tipo de carga simulada na sobrevida e crescimento celular no tecido cartilaginoso. Além disso, o implante contendo o *scaffold* com propriedades otimizadas proporcionou maior desenvolvimento de tecido cartilaginoso, enquanto o tratamento da lesão sem o *scaffold* resultou em maior desenvolvimento de tecido ósseo e fibroso (KOH *et al.*, 2019).

Scaglione e colaboradores (2014) também discutiram como as propriedades dos *scaffolds* devem ser precisamente estudadas para atender as necessidades da sua aplicação. Os autores avaliaram a porosidade, área de superfície, permeabilidade, módulo de elasticidade e resistência a encurvadura de um modelo de *scaffold* formado por feixes cilíndricos paralelos, desenhado para reduzir a vascularização durante a regeneração da matriz condral. As propriedades calculadas foram normalizadas com valores tipicamente encontrados em tecidos cartilagosos descritos na literatura (módulo de elasticidades: 2 MPa, resistência à encurvadura: 3 MPa - correspondente à carga fisiológica do corpo -, permeabilidade de  $1$  a  $4 \times 10^{-17}$  m<sup>2</sup> e área de superfície de 2 mm<sup>-1</sup>).

Considerando-se aceitáveis valores entre 1 e 4 vezes os valores de referências, os autores determinaram uma condição de razão entre a distância entre os feixes cilíndricos e seus raios (razão igual a 1) em que as propriedades medidas do *scaffold* encontram-se na faixa aceitável. Tal condição foi utilizada na fabricação do *scaffold* de poli-ε-caprolactona (PCL), o qual foi produzido com feixes de 200 μm espaçados por 200 μm, os quais foram posteriormente caracterizados e inoculados com condrócitos bovinos. Embora o *scaffold* fabricado tenha apresentado resistência à encurvadura e porosidade consideravelmente diferente dos valores calculados, o material apresentou módulo de elasticidade ( $2,9 \pm 0,8$  MPa) próximo do valor de referência e foi capaz de prevenir a vascularização do tecido e proporcionar poros adequados para o crescimento de condrócitos em estrutura colunar, assim como a produção de matriz extracelular, ao longo das 9 semanas de regeneração da lesão de cartilagem em modelo animal (SCAGLIONE *et al.*, 2014).

Wasyleczko, Sikorska e Chwojnowski (2020) descreveram, em uma revisão da literatura, as características necessárias de *scaffolds* para aplicações em regeneração de cartilagem articular. Além das superfícies dos *scaffolds* necessitarem de rugosidade e presença de moléculas que promovam uma adesão adequada dos condrócitos ou células mesenquimais, os poros desses suportes e o microambiente criado devem ser compatíveis com as necessidades de cada uma dessas células; enquanto condrócitos articulares requerem poros de 150-250  $\mu\text{m}$ , espaços mais compartimentados com baixa tensão de oxigênio e cisalhamento, células tronco mesenquimais requeem um ambiente com características opostas e poro maior ou igual a 300  $\mu\text{m}$ .

Somam-se a essas características, a necessidade de resistência compatível à carga ao qual o tecido cartilaginoso é submetido, biocompatibilidade do material selecionado e degradabilidade controlada do *scaffold*. O tamanho e formato dos poros podem ser cruciais na prevenção da desdiferenciação de condrócitos em fibroblastos e no estímulo à produção de matriz extracelular (WASYŁECZKO; SIKORSKA; CHWOJNOWSKI, 2020). A manutenção do fenótipo adequado ao tecido é extremamente importante, uma vez que a diferenciação de células em fibroblastos com sua subsequente exposição a cargas e tensões no local do implante causa a morte dessa linhagem celular, conforme demonstrado por Koh e colaboradores (2019).

Devido às dificuldades de se obter *scaffolds* naturais com a resistência necessária para esse tipo de aplicação, o uso de *scaffolds* híbridos (membranas sintéticas biocompatíveis preenchidas com substâncias da matriz extracelular de cartilagem) têm sido a melhor alternativa para a disponibilização das propriedades biológicas e mecânicas necessárias para o desenvolvimento do tecido cartilaginoso (WASYŁECZKO; SIKORSKA; CHWOJNOWSKI, 2020).

Turnbull e colaboradores (2018), contribuíram grandemente com a comunidade científica ao revisar as principais tecnologias de *scaffolds* bioativos tridimensionais para engenharia de tecidos ósseos. Embora, em geral, as mesmas características de *scaffolds* projetados para engenharia de tecidos cartilaginosos se apliquem a tecidos ósseos, os autores ressaltam a necessidade das matrizes serem facilmente manipuladas em diferentes formatos para atender as necessidades cirúrgicas e recuperação da lesão óssea. Particularmente para a engenharia de tecidos ósseos, a resistência do material deve ser maior e sua biodegradação mais tardia, para se evitar fraturas do implante; é desejado que o material se conecte aos tecidos hospedeiros e não ocasione resposta inflamatória.

Os autores também descrevem o potencial uso de proteínas morfogênicas ósseas (BMP), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento transformante  $\beta$  (TGF $\beta$ ),

fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento similar a insulina 1 (IGF-1), fator de crescimento de fibroblasto (FGF) nos *scaffolds* para engenharia de tecido ósseo como forma de promover a penetração das células nos poros e suas diferenciações em células ósseas (osteogênese). Os poros desses *scaffolds* devem ter mais de 150  $\mu\text{m}$ , porosidade de 60 a 90% e módulo de elasticidades de 7 a 30 GPa (TURNBULL *et al.*, 2018).

Dadas as relações muitas vezes antagônicas das propriedades de *scaffolds*, as necessidades das aplicações desses materiais e as particularidades do cultivo de células até a formação e regeneração de tecidos, o desenvolvimento da engenharia de tecidos como um campo interdisciplinar é essencial para o avanço tecnológico da área. Para viabilizar o uso terapêutico de tecidos engenheirados, conhecimentos de física, química e bioquímica são mobilizados para desenvolver processos e formulações das matrizes porosas e imobilização de moléculas sinalizadoras ou grupos funcionais que promovem o ancoramento de células.

Além disso, métodos de ciência e engenharia de materiais são utilizados para avaliar as propriedades biomecânicas do *scaffold*, conhecimento de engenharia de (bio)processos são necessários para estabelecer as condições de processo e seu escalonamento e todas essas ciências devem dialogar a todo momento com alto grau de expertise sobre a biologia celular e molecular das células, sob a perspectiva clínica e cirúrgica, e porque não, regulatória.

### **2.2.2.1 Aspectos econômicos da engenharia de tecidos**

Apesar das promessas e sucesso que a engenharia de tecidos tem mostrado, muitas informações sobre o processo de produção de tecidos *in vitro* permanecem imprecisas, dado o recente desenvolvimento da área e a complexidade do sistema celular. Alguns exemplos de tais indefinições são as concentrações ideais de fatores de crescimento e moléculas de adesão (p. ex., moléculas com a sequência arginina-glicina-asparagina, conhecida como RGD) para a formação do tecido (GRIFFITH; NAUGHTON, 2002; IKADA, 2006).

A partir dos estudos de mercado de engenharia de tecidos apresentados nos parágrafos subsequentes, é possível perceber que, em paralelo ao desenvolvimento tecnológico e novas descobertas sobre o comportamento celular em tecido cultivado *in vitro*, fatores extrínsecos ao desenvolvimento da técnica trazem desafios aos pesquisadores e *startups* da área, ao mesmo tempo que direcionam os rumos do desenvolvimento da engenharia de tecidos. Exemplos de tais fatores são a repercussão das potencialidades da engenharia de tecidos, o nível de sua aceitação por parte de profissionais da medicina regenerativa e a abordagem de avaliação e aprovação desses produtos por parte das agências regulatórias.

Compilando os dados de relatórios de avaliação das indústrias e produtos de engenharia de tecidos no mercado mundial publicados por Lysaght e colaboradores (1998, 2004, 2008) desde 1998, e nos EUA entre os anos de 2011 e 2018 (KIM *et al.*, 2018), é possível verificar claramente um direcionamento do foco das indústrias envolvidas neste setor para produtos mais simples (biomateriais) e para a produção de células tronco para terapia celular. De acordo com Lysaght (2008) esta mudança de estratégia está relacionada tanto às experiências frustrantes das empresas com o processo de aprovação dos produtos pelo FDA e com o volume de vendas e investimentos aquém das expectativas consideradas nas análises de viabilidade dos negócios, quanto ao desenvolvimento e aquisição de conhecimento sobre as áreas de terapia celular e biomateriais.

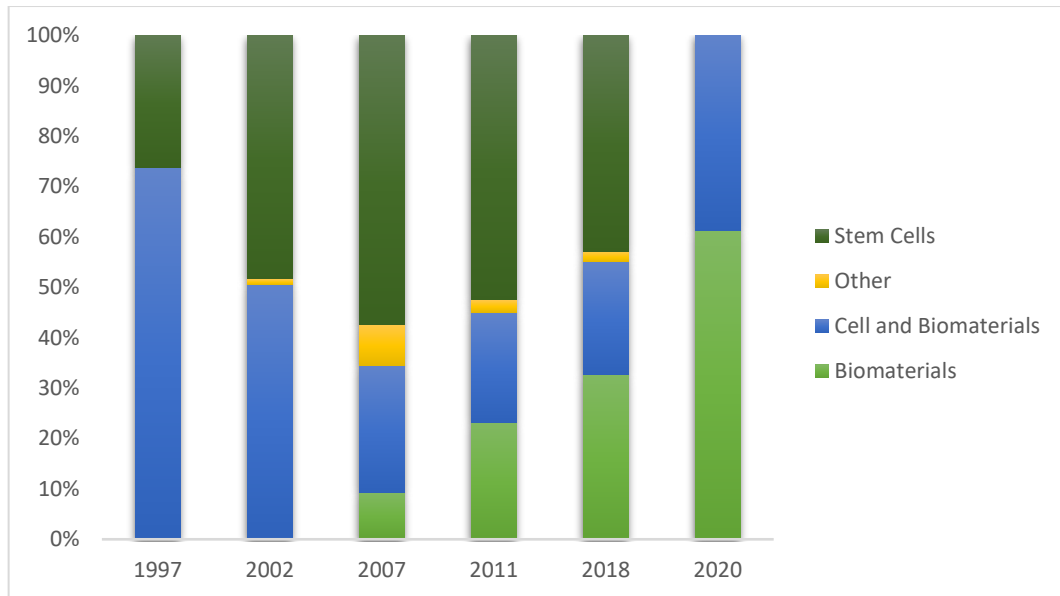
Os agentes econômicos teriam, dessa forma, compreendido que produtos analisados pelo Center for Devices and Radiological Health (CDRH) (como a matriz para preenchimento ósseo Grafton™ e outros aloenxertos), além de apresentarem mais facilidade de produção, requerem menos tempo de aprovação pelo departamento regulatório e investimento, resultando em vantagens econômicas consideráveis, quando comparadas com produtos que se enquadram na classificação de biofármacos e terapia celular (KIM *et al.*, 2018).

A Figura 2 mostra essa mudança de escopo e investimento na engenharia de tecidos desde 1997. A grande expectativa da aplicação da engenharia de tecidos (mais especificamente de tecidos e órgãos produzidos *in vitro*) e as narrativas promissoras (STEPHENS; KING; LYALL, 2018) advindas não só de pesquisadores, mas também entusiastas da ciência e da mídia nos anos 90 não se concretizaram como esperado, o que pode ter contribuído com a redução dos esforços para produção de tecidos e órgão como produtos, a partir de 2002 (LYSAGHT; NGUY; SULLIVAN, 1998; LYSAGHT; JAKLENEC; DEWEERD, 2008). Desde então, a área de células tronco tem ganhado espaço no mercado mundial de engenharia de tecidos, enquanto os biomateriais começaram a ter proeminência a partir de 2007.

Em 2018, por exemplo, empresas focadas na produção de células tronco e biomateriais corresponderam a aproximadamente 75% do mercado de engenharia de tecidos dos EUA. A distribuição das frentes de desenvolvimento tecnológico da engenharia de tecidos também mudou; até 2002, os autores classificavam os produtos da engenharia de tecidos em três grupos: estrutural (correspondendo a *scaffolds*, tecidos, pele, cartilagem, tecido ósseo), metabólico (rins, pâncreas e fígado artificiais) e celular (células troncos e transplante celular) (LYSAGHT *et al.*, 1998, 2004). De 2007 em diante, frente às próprias alterações de atividades da área e do entendimento sobre ela, adotaram-se os grupos biomateriais, célula + biomateriais e células tronco (LYSAGHT *et al.*, 2008; KIM *et al.*, 2018). Essa foi a classificação utilizada para

elaborar a Figura 2, onde os dados referentes aos grupos “estrutural e metabólico” foram classificados como “célula e biomateriais”.

Figura 2 - Perfil de produtos de engenharia de tecido ao longo do tempo



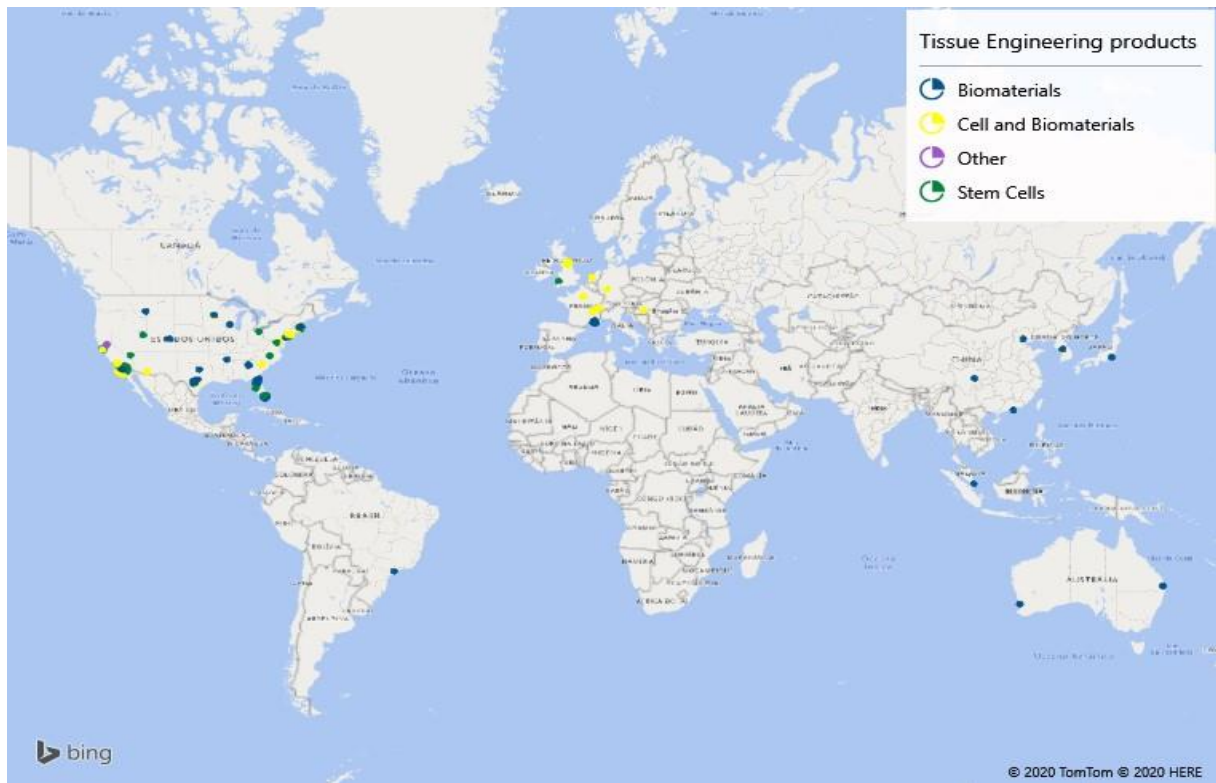
Fonte: Elaborado por Willer Ferreira da Silva Junior, 2020, por meio da tabulação dos resultados publicados por Lysaght e colaboradores (1998, 2004, 2008), Jaklenec e co-autores (2012), Kim e colaboradores (2018) e pelo site (banco de dados) BioPharmGuy (2020). Os dados de 2018 referem-se apenas a empresas públicas dos EUA, enquanto os de 2020 contemplam um número limitado de empresas (de todo o mundo) associadas ao banco de dados.

A Figura 3 mostra uma prevalência de indústrias de produtos do tipo biomateriais e célula tronco em alguns países da Ásia e de produtos do grupo células + biomateriais e célula tronco em países da Europa, enquanto os EUA lideram não só em números de empresas, mas em diversidade de produtos no mercado de engenharia de tecidos. As análises de mercado descritas nos parágrafos anteriores e nas figuras 2 e 3 indicam que a viabilidade dos produtos de engenharia de tecidos depende das suas propriedades biológicas e regenerativas – o que os garantem a aprovação para uso humano -, suas propriedades mecânico-estruturais, bem como da sua viabilidade econômica.

Tan e colaboradores (2015), por exemplo, utilizaram como estudo de caso a avaliação da viabilidade econômica de enxertos endoteliais para córnea, comparando os seus custos com os envolvidos no transplante de tecido alógeno e considerando ambas as terapias com eficácias iguais. Partindo dessa premissa, os custos fixos e variáveis das duas estratégias foram variados para verificar a sensibilidade do modelo de minimização de custo, o qual demonstrou que o

principal determinante de tal viabilidade é o custo relacionado à obtenção da córnea (tecido alógeno).

Figura 3 - Distribuição de empresas e tipos de produtos de engenharia de tecidos pelo mundo



Fonte: Elaborado por Willer Ferreira da Silva Junior, 2020, por meio da tabulação dos resultados publicados por Lysaght e colaboradores (1998, 2004, 2008), Jaklenec e co-autores (2012), Kim e colaboradores (2018) e pelo site (banco de dados) BioPharmGuy (2020). Os dados de 2018 referem-se apenas a empresas públicas dos EUA, enquanto os de 2020 contemplam um número limitado de empresas (de todo o mundo) associadas ao banco de dados. O tamanho das bolhas representa o número de empresas da categoria indicada pela cor da bolha na região; a figura refere-se aos dados dos relatórios de 2012 (JAKLENEC *et al.*, 2012), 2018 (KIM *et al.*, 2018) e os disponíveis no banco de dados BioPharmGuy (2020).

### 2.3 MODELAGEM DE SISTEMAS COMPLEXOS

Os benefícios do uso de modelos matemáticos e computacionais que descrevem o comportamento de sistemas biológicos são bastante conhecidos. Os modelos podem ser usados não só para simular e prever as respostas do sistema em determinadas condições de cultivo, mas também para caracterizar o sistema, por meio da solução analítica do modelo matemático nas condições específicas para a identificação de transição de fase, comportamento do sistema em regime estacionário, pontos de bifurcação, convergência e divergência (BEQUETTE, 1998).

Além disso, a construção de modelos matemáticos de sistemas biológicos robustos é essencial para o desenvolvimento de estratégias e tecnologias de automação do controle de

processos biológicos em reatores (NICOLETTI; JAIN, 2009) - como ocorre no cultivo de células CHO para produção de anticorpos monoclonais, cultivo de células autógenas, para a terapia celular, cultivo de células de diferentes linhagens para produção de partículas virais na fabricação de vacinas.

Dentre as abordagens de modelagem utilizadas em sistemas complexos citam-se: a abordagem analítica, a abordagem sistêmica e a abordagem construtivista (muitas vezes considerada parte da abordagem sistêmica). A abordagem analítica é muitas vezes utilizada em sistemas determinísticos, onde o sistema é isolado em pequenas partes e um número limitado de interações lineares e/ou não lineares é representado matematicamente. Posteriormente, a soma da descrição dessas partes é utilizada para descrever o sistema (AZIZA *et al.*, 2016).

Na abordagem sistêmica tradicional, fenômenos macroscópicos são descritos considerando-se que eles são frutos das interações entre os elementos (modelagem top-down) e suas interações resultam em fenômenos emergentes. Em outra abordagem utilizada, regras de interações entre os agentes são descritas e a simulação dessas interações é utilizada para representar a emergência do fenômeno macroscópico (modelagem bottom-up). Exemplos dessas abordagens são modelos baseados em regras condicionais e redes neurais artificiais (AZIZA *et al.*, 2016).

Já na abordagem sistêmica construtivista, a modelagem sinérgica e a microsimulação modelam indivíduos que tomam decisões baseadas em parâmetros estocásticos e/ou em um histórico de decisões passadas, sendo, portanto, uma abordagem probabilística (como a inferência Bayesiana, por exemplo). Esse tipo de modelagem a nível de agente tem como limitação o fato de que o agente não é influenciado pelo resultado coletivo das ações dos demais agentes, nem pela dimensão espacial. Por outro lado, autômatos celulares podem ser utilizados como alternativa que supera tais limitações (AZIZA *et al.*, 2016; BATTY; TORRENS, 2001).

Autômatos celulares são formados por uma malha de células computacionais idênticas que seguem regras homogêneas de decisão baseadas na vizinhança imediata de cada célula. Cada célula unitária pode assumir o status de vazia ou ocupada e em alguns casos, tomar decisões baseadas em uma vizinhança expandida, como ocorre quando se utilizam as vizinhanças de Moore ou Van Newman com  $r$  (camada de células do entorno) maior que 1. Portanto, trata-se de um modelo de espaço e tempo discretos, no qual o status de cada célula é atualizado ao fim de cada iteração (AZIZA *et al.*, 2016; BATTY; TORRENS, 2001).

Diferentemente da modelagem por autômatos celulares, na modelagem baseada em múltiplos agentes os elementos modelados podem se deslocar pelo espaço discreto livremente, ou por meio de regras heterogêneas, além de compartilhar o mesmo espaço com mais de um



agente. As tomadas de decisão dos agentes também podem levar em consideração o ambiente coletivo ou vizinhanças distantes, possibilitando a obtenção de maior realidade do modelo (AZIZA *et al.*, 2016).

A modelagem baseada em agentes é uma técnica computacional cujo desenvolvimento se deu em paralelo com as novas descobertas das tecnologias computacionais (WILENSKY; RAND, 2015); atualmente, talvez seja possível falar em uma relação mutualística entre as duas áreas. Diferentemente dos métodos de modelagem tradicionais que seguem a teoria de campo médio, a modelagem baseada em agentes transfere o foco da representação global do sistema - por meio de relações que descrevem de modo generalizado o resultado dos comportamentos de partes iguais - para a representação de suas partes (agentes), deixando-as interagir e emergir os fenômenos macroscópicos outrora descritos pelos modelos tradicionais.

Dessa forma, tal técnica de modelagem permite considerar a diversidade dos agentes - objetos autônomos, com características, capacidade de decisão e (em alguns casos) capacidade de aprendizado - e seus efeitos nos fenômenos observados. Essa abordagem, além de facilitar a representação e solução matemática, permite representar os elementos de forma mais realística, ao considerar regras simples de comportamento e interação entre os agentes e deles com o ambiente, conforme observado nos fenômenos naturais e sociais. Além disso, tal técnica de modelagem também permite o uso de dados empíricos obtidos de banco de dados e *big data analysis* para aproximar o modelo da realidade (WILENSKY; RAND, 2015).

Quando essas regras representam as interações e reações de agentes, elas são classificadas como mecanísticas, em contraste com regras que mimetizam ou resumem um conjunto de respostas de um agente em um único comportamento, estas chamadas regras fenomenológicas. Ambas as formas de definir as regras de comportamento dos agentes devem ser criteriosamente selecionadas, uma vez que dizem (também) respeito à escala de observação dos fenômenos oriundos do modelo e influenciam a sua acurácia (GLEN; KEMP; VOIT, 2019). Comportamentos correlacionados modelados por regras mecanísticas por exemplo, podem resultar em aumento da demanda de processamento e armazenamento de dados, sem agregar informações relevantes sobre o sistema estudado, ao passo que a representação inapropriada de um mecanismo ou comportamento de agentes por uma regra de natureza fenomenológica pode impedir que fenômenos emergentes sejam observados ao longo das simulações.

Um modelo majoritariamente definido por regras fenomenológicas, por exemplo, resulta em uma abordagem “top-down”, enquanto quando ele é predominante composto por regras mecanísticas, a abordagem é considerada “bottom-up” (GLEN; KEMP; VOIT, 2019).

## 2.4 MODELAGEM DE CULTURA DE CÉLULAS 2D, 3D E DE TECIDOS

Vários modelos matemáticos foram propostos ao longo dos anos para descrever o crescimento celular (de um modo geral), tais como os modelos de crescimento exponencial e logístico, modelo de Monod, efeito Allee e o modelo Baranyi. Em suma, esses modelos baseiam-se em um sistema de equações de balanços de massa para células, substratos, nutrientes, metabólitos e produtos e utilizam técnicas analíticas ou numéricas para a solução das equações diferenciais. Entretanto, esses modelos geralmente não levam em consideração as interações célula-célula e sinalizações celulares, o que limita sua acurácia e sua capacidade de representar fenômenos emergentes. No intuito de superar tais limitações, outras técnicas vêm sendo utilizadas, tais como simulação de Monte Carlo, autômatos celulares e modelagem baseada em agentes (CHARLEBOIS; BALÁZSI, 2018).

Qu e colaboradores (2004) desenvolveram um modelo matemático com base no conhecimento acerca das vias de sinalização de transdução presentes no crescimento celular, o qual relaciona a taxa de crescimento celular com o tamanho da célula (área da superfície ocupada por ela) logo após a divisão celular. Os autores aplicaram o modelo ao ciclo de divisão de células HeLa, comparando-o com os dados experimentais de Zetterberg e Larsson (1995); o modelo foi assertivo quanto à representação do conceito de tamanho e tempo críticos (tamanho e tempo a partir dos quais a célula cresce por um tempo constante e se divide, respectivamente), mas se contrapôs à hipótese de Zetterberg e Larsson, mostrando que o atraso na mitose (causado pela supressão de soro contendo fatores de crescimento) de células novas não era constante, mas sim dependente da taxa de crescimento e idade da célula. Os autores reconheceram que o modelo possui uma série de limitações – muitas delas relacionadas às premissas adotadas para o desenvolvimento do modelo – as quais foram evidenciadas pelos dados experimentais divergentes dos resultados preditos.

Connor e seus co-autores (2019) desenvolveram um modelo experimental de co-cultura 3D de células cancerígenas do epitélio mamário e células saudáveis endoteliais para estudar a dinâmica de invasão de tecidos pela transposição de células tumorais pelas junções entre células dos tubos endoteliais, no processo de metástase. Um modelo matemático também foi criado para analisar a energia do sistema celular durante a interação célula-célula no processo de transposição de células tumorais pelo tecido saudável.

No modelo matemático, as células foram tratadas como esferas sólidas de propriedade hiper elástica neo-Hookeana - material que não obedece a relação linear entre deformação e tensão prevista na lei de Hooke (KIM *et al.*, 2012). Dois cenários foram comparados; no cenário

1, as células epiteliais esferoidais rompem espaço entre as células endoteliais, e a função de densidade de energia pode ser calculada pela relação de tensão de elasticidade das células; no cenário 2, foi considerado que as células cancerígenas rearranjam o citoesqueleto para uma estrutura fibroblástica, sendo que a função de densidade de energia desse processo de deformação/rearranjo de citoesqueleto pode ser calculada como no trabalho de Yap e colaboradores (2005), por meio de valores de concentração de filamentos actina (obtidos pela relação entre esse parâmetro e a circularidade da células) e a equação de energia livre de ligação de monômeros g-actina (CONNOR *et al.*, 2019).

Esse modelo foi baseado na mecânica de rearranjo de citoesqueleto observada em neutrófilos, dada a disponibilidade de dados e informações desse fenômeno nesse tipo de células, devido à sua capacidade de rápida reorganização de seu citoesqueleto para transposição por junções apertadas em tecidos (CONNOR *et al.*, 2019).

Dessa forma, Connor comparou as energias gastas pela célula cancerígena para se transpor pelos interstícios do tecido endotelial nos dois cenários e confrontou os resultados da simulação com os obtidos pelo modelo experimental de co-cultura. Os resultados do modelo matemático reiteraram as observações colhidas do modelo experimental, mostrando que o alongamento das células cancerígenas é essencial (e energeticamente favorável) para o seu pareamento às células endoteliais e subsequente transposição pelos vasos endoteliais no processo metastático (CONNOR *et al.*, 2019).

Já no campo da engenharia de tecidos, diferentes modelos têm sido desenvolvidos para representar o crescimento celular em nível tecidual. Pesquisadores do Instituto Pasteur do Iran e da Universidade do Tehran modelaram a cultura estática e dinâmica (perfusão) de células de osteossarcoma humano em *scaffold* cilíndrico de 3 mm de altura e 13 mm de diâmetro, com porosidade 0,8. O deslocamento do fluido ao longo do *scaffold* foi descrito pela equação de Brinkman – onde o fluido possui perfil parabólico no deslocamento em cilindro - e as taxas de variação de densidade celular, oxigênio e nutrientes foram determinadas por meio de equações diferenciais parciais obtidas a partir de balanços de massa com rendimento célula-substrato constante (MOKHTARI-JAFARI, 2016).

Esse modelo foi capaz de prever que a densidade celular no cultivo dinâmico (aumento de 53,5 e 49 vezes da densidade inicial nos resultados experimentais *in vitro* e *in silico*, respectivamente) seria maior que no estático (aumento de 42 e 37 vezes da densidade inicial nos resultados experimentais *in vitro* e *in silico*, respectivamente) após 21 dias de processo e que a distribuição de células ao longo do *scaffold* seria mais uniforme na cultura em perfusão (MOKHTARI-JAFARI, 2016).

Por meio de uma abordagem similar, Catt e colaboradores (2011) modelaram a formação de tecido a partir da cultura de condrócitos em filtro por equações diferenciais parciais de distribuição das células e dos glicosaminoglicanos (GAG). O modelo se mostrou capaz de reproduzir o crescimento da espessura da cartilagem pelo crescimento celular na região mais alta do tecido, além de evidenciar que, embora as células secretem GAG a uma taxa constante (fenômeno dependente da agregação de células), há várias regiões quiescentes no tecido, onde o crescimento celular (associado à presença de outros componentes da MEC, tais como o colágeno) é desprezível.

A maior parte dos trabalhos de modelagem de cultura de células 3D encontrados na literatura combina dados empíricos, descritos na literatura ou obtidos de experimentos do mesmo grupo de pesquisa, com modelos físicos e cinéticos para a modelagem do sistema biológico em questão. Os dados empíricos são utilizados tanto para a construção da teoria por detrás do modelo (como no caso daqueles que descrevem vias metabólicas caracterizadas em estudos de biologia celular e molecular) quanto para calibrar (estimação de constantes e adimensionais das equações) e validar o modelo. Tais trabalhos geralmente utilizam modelos contínuos, de equações diferenciais parciais, que são resolvidas numericamente na maioria das vezes. Além disso, muitos dos modelos apresentam baixa acurácia, quando comparados com dados experimentais, e não explicam pontos anômalos observados no cultivo de tecidos, embora os autores afirmem quase unanimemente, nas conclusões dos trabalhos, que os modelos apresentaram grande concordância com os dados experimentais.

Burova, Wall e Shipley (2019) fazem uma interessante revisão de modelos utilizados para descrever a engenharia de tecidos ósseos em diferentes reatores. Além dos modelos contínuos discutidos anteriormente, os autores descrevem os modelos discretos empregados na área de engenharia de tecidos: autômatos celulares (células adotam estados discretos, ciclos de diferentes tempos e posição espacial determinada por algoritmos de caminhada aleatória), modelo baseado em agentes, modelo de Potts – baseado no modelo de Monte Carlo de malha discreta, onde as células se movimentam de modo a minimizar a função de energia Hamiltoniana e se agregam pela energia de contato -, e o modelo baseado na força celular (o comportamento celular é previsto sob a perspectiva de um equilíbrio de forças nas interações célula-célula e célula-MEC). Os autores descrevem o uso de modelos multifásicos e CFD (*Computational Fluid Dynamics*) em cultivos em frascos rotatórios, modelos contínuos e discretos em cultivos em perfusão, CFD e modelo multifásico celular em cultivos em reator de fibra oca.

Torii e colaboradores (2018) modelaram e simularam um tecido muscular engenheirado baseado nos dados experimentais de Smith e co-autores (2012), no qual células derivadas de tecido muscular foram inoculadas em um arcabouço 3D de colágeno de dimensões 30 mm × 20 mm × 12 mm por 14 dias. A deformação do *scaffold* causada pelas forças de contração das células foi simulada por meio da solução das equações de equilíbrio de forças pelo método dos elementos finitos (malha composta de cubos de 1 mm - elementos) no software ANSYS Mechanical. Por outro lado, o comportamento das células foi simulado com um modelo baseado em agentes, construído no MATLAB. Nesse modelo, as células se deslocam em direção à maior tensão local e cada uma delas exerce uma força contrátil de 1 nN.

Inicialmente, as células foram aleatoriamente distribuídas e orientadas no espaço representativo do *scaffold*. A cada rodada, a tensão contrátil causada pelas células de um cubo era calculada e transferida para as extremidades do elemento; em seguida, as células se deslocavam na direção da maior tensão local. Após a compilação do programa por um período de 7 dias (dimensão computacional), as representações gráficas da escala de tecido (método dos elementos finitos) e escala celular (modelo baseado em agentes) representaram fielmente o formato do *scaffold* do experimento laboratorial (formação de um sulco na região média do arcabouço, devido às forças contráteis das células musculares). Além disso, a área do *scaffold* ao longo dos dias de cultivo medida no experimento *in vitro* esteve muito próxima da calculada a partir dos experimentos *in silico* e a variabilidade dos experimentos foram de 39 e 36%, respectivamente (TORII *et al.*, 2018).

González-Valverde e García-Aznar (2018) também desenvolveram um modelo computacional híbrido composto de método dos elementos finitos e modelagem baseada em agentes para simular a migração coletiva de células nas camadas epiteliais. O tecido foi modelado como um meio contínuo e com domínios espaciais diferenciais deformados pela presença das células no espaço avaliado. O modelo foi validado com o uso de dados experimentais da literatura para dois casos bem conhecidos de migração coletiva: durotaxis e “*gap closure*”, cujos resultados simulados apresentaram grande concordância com os experimentais.

Cheng, Youssef, Markenscoff e Zygorakis (2006) desenvolveram um modelo de autômatos celulares em três dimensões para estudar o processo de cicatrização de feridas, sem levar em consideração uma linhagem celular específica. O modelo considerou um meio altamente poroso, de modo que as células pudessem se deslocar livremente (em caminhadas aleatórias) ao longo de sua vizinhança de van Neumann pelo seu respectivo tempo de persistência, até se colidir com outra célula. O modelo também desconsiderou a morte celular

e gradientes de concentração de nutrientes. Após completo o tempo do ciclo celular, a célula se divide, sendo que a nova célula ocupa um dos espaços vacantes do entorno da célula originadora com probabilidade  $p$ . Neste estudo, foram avaliados diferentes tempos de ciclo celular e persistência, bem como velocidades de deslocamentos e modos de inoculação distintos.

Os resultados das simulações computacionais mostraram que a velocidade de deslocamento possui importante papel na recuperação da lesão/ferida, mas que velocidades altas em modelos de inoculação uniforme anulam o benefício de ocupação do *scaffold* por células proporcionado pelo deslocamento. Por outro lado, quando as células são inoculadas de forma concentrada em uma região, o aumento tanto do tempo de persistência quanto da velocidade de deslocamento das células melhora a recuperação do tecido. Tais resultados são confirmados experimentalmente, segundo os autores (CHENG; YOUSSEF; MARKENSCOFF; ZYGOURAKIS, 2006).

Chung e colaboradores (2010) desenvolveram um modelo baseado em autômatos celulares similar ao de Cheng e colaboradores (2006) para representar uma cultura de células aderentes em escala 2D (à guisa de simplificação). Neste modelo, cada célula foi representada pela ocupação de um *lattice* de tamanho  $\Delta L$  (escala espacial celular) = 8,5  $\mu\text{m}$  dividido em  $n$  unidades discretas de altura  $\Delta y$  e largura  $\Delta x$  (escala espacial utilizada para cálculo das concentrações de oxigênio no *scaffold*). 290 células foram uniformemente distribuídas em uma malha de dimensões 588x68 e seus tempos de ciclo celular foram definidos baseado em uma distribuição gama, enquanto as direções de suas caminhadas aleatórias foram definidas aleatoriamente entre as 8 direções possíveis (vizinhança de Moore).

A cada unidade  $\Delta t_n$  de tempo (a qual varia de 1 a 100 segundos), a concentração de oxigênio ao longo do *scaffold* foi calculada por meio da equação diferencial de reação-difusão, enquanto a cada unidade de tempo  $t$  (dimensão celular), cada célula avaliava a sua vizinhança de Moore ( $r = 1$ ) para verificar se os *lattices* da vizinhança estavam ocupados (inibição por contato); caso não houvesse inibição por contato, as células poderiam se dividir ou mudar de direção na caminhada aleatória (caso o contador específico fosse igual a 0), sendo que no caso de colisão entre células, ambas adotariam um estado estacionário (CHUNG *et al.*, 2010).

Os resultados obtidos para velocidades das células determinadas estocasticamente e deterministicamente foram similares. A taxa de ocupação do *scaffold* por células foi maior durante a maior parte da simulação quando se adotou uma velocidade de deslocamento igual a 25,5  $\mu\text{m/h}$  para as células, enquanto no período final da simulação, os resultados obtidos foram aproximadamente os mesmos para as três velocidades estudadas. A inoculação de células no

meio do *scaffold* demonstrou ser a melhor condição dentre as comparadas, com maior ocupação do espaço (CHUNG *et al.*, 2010). Embora este modelo tenha enfatizado o deslocamento e colisões celulares e avaliado seus impactos no crescimento da cultura de células, as células foram modeladas como autômatos celulares quadrados de tamanho fixo  $\Delta L$ ; isso implica que os comportamentos de inibição por contato e colisão ficam limitados à área do *lattice* da célula e sua vizinhança de Moore, diferente do que se observa em culturas de células aderentes, nas quais o citoesqueleto das células formam extensos prolongamentos capazes de fornecer estímulos sensoriais (comunicação celular) que afetam o deslocamento e proliferação celular (KULAWIAK; CAMLEY; RAPPEL, 2016; LI; WANG, 2018; LARIVE *et al.*, 2010; MAYOR; ETIENNE-MANNEVILLE, 2016).

A partir dos estudos de modelagem de cultura de células 2D e 3D disponíveis na literatura especializada, percebe-se que o uso da modelagem baseada em agentes no estudo e compreensão da cultura de células 3D é recente e pouco expressiva, especialmente na área de engenharia de tecidos, na qual a maior parte dos modelos propostos é do tipo contínuo de campo médio. Por outro lado, essa técnica de modelagem vem sendo explorada em maior velocidade na oncologia, tanto para suportar a compreensão do comportamento das células e tecidos tumorais, quanto para a avaliação de drogas para o tratamento do câncer. Nos casos de uso da modelagem baseada em agentes em sistemas celulares, os resultados têm sido representativos dos dados experimentais, possibilitando a observação de fenômenos não triviais. Além disso, tais benefícios são potencializados com o uso de outras técnicas, tais como o método dos elementos finitos.

#### **2.4.1 Design e modelagem de *Scaffolds* para aplicação em (simulação de) cultivo de tecidos**

Conforme mencionado anteriormente, ao longo do texto, o *scaffold* é uma estrutura tridimensional porosa (fabricada a partir de diferentes polímeros) que mimetiza estruturas de suporte em sistemas biológicos (tais como colágeno, elastina) ou a matriz extracelular como um todo, possuindo, dessa forma, não só a função estrutural, mas também de mediador de comunicação celular, de direcionamento das células e modulação celular. Junto às células e estímulos químicos (fatores de crescimento) e/ou eletromecânicos (obtidos por meio de biorreatores específicos), os *scaffolds* possibilitam o desenvolvimento de diferentes tipos de tecidos (CHAN; LEONG, 2008; O'BRIEN, 2011).

Para que tais constructos de tecido possam ser utilizados como produtos na engenharia de tecidos e para que seja possível cultivar as células no *scaffold* de modo a obter o tecido com as características desejadas, é necessário avaliar a adequabilidade das propriedades (além de biocompatibilidade e biodegradabilidade) de tal *scaffold*. Exemplos dessas propriedades são: porosidade, tamanho do poro e área de superfície (determinantes para o crescimento das células), módulo de elasticidade (importante para o tipo de aplicação do tecido) e permeabilidade (necessário para a transferência de massa – nutrientes, oxigênio, metabólitos) (EGAN *et al.*, 2017). Além dessas características, é desejado que os poros do arcabouço sejam interconectados, que a arquitetura possua micro e macroporos, além de possibilitar a formação de canais vasculares, possuir moléculas em sua constituição que promovam o crescimento e aderência das células e alta área de superfície (TURNBULL *et al.*, 2018).

Os métodos tradicionais de fabricação de *scaffold* de matriz polimérica natural e sintética envolvem reações de polimerização, uso de solventes, necessidade de controle preciso de temperatura, pressão de reação, além de resultarem em variabilidade das propriedades do arcabouço. Por outro lado, as técnicas de impressão 3D – tais como SLA, SLS, FDM, Inkjet, laser-assisted, microválvula e microextrusão -, amplamente desenvolvidas nos últimos anos, possibilitam a fabricação de arquiteturas customizadas (a depender do tipo de tecido a ser produzido) e biomimetizadas, com alta reprodutibilidade, resolução em escala micrométrica e com propriedades físicas e mecânicas planejadas (TURNBULL *et al.*, 2018).

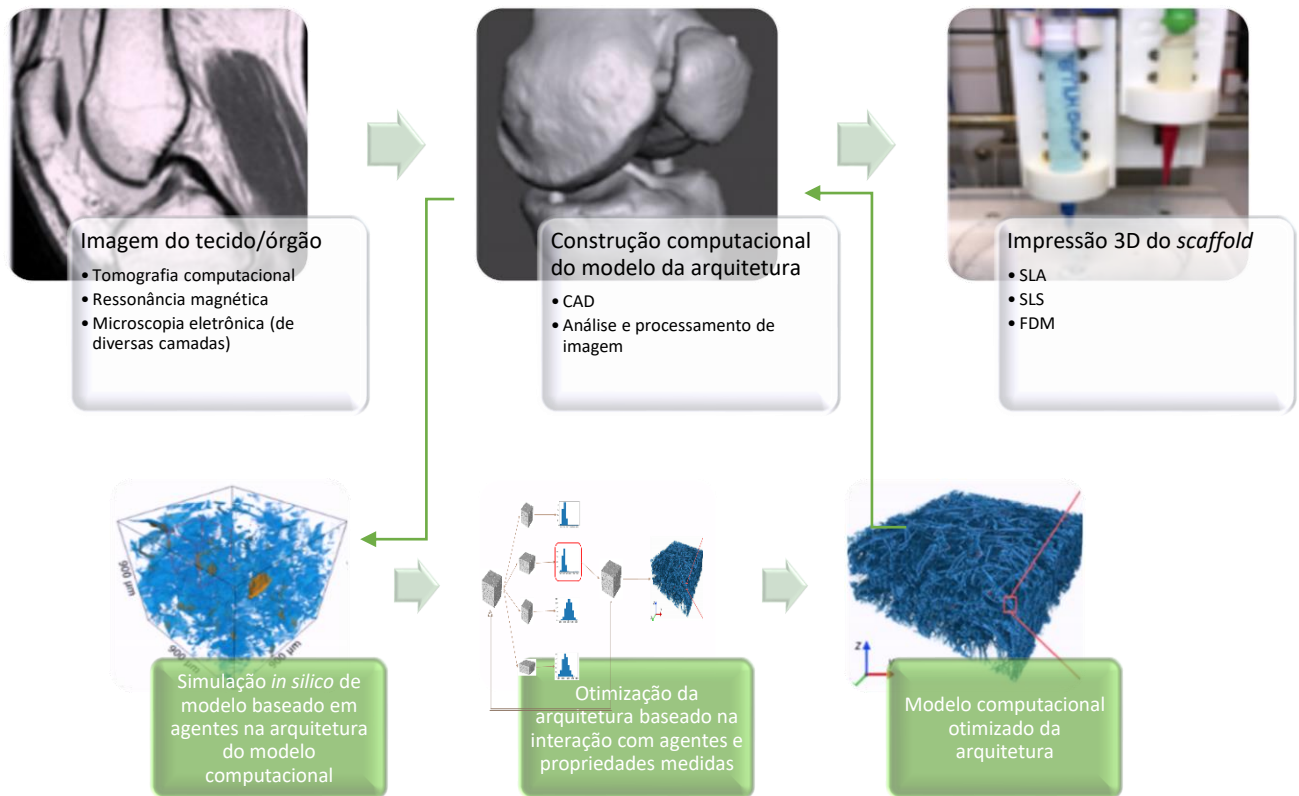
O modelo da arquitetura é construído em computador por meio de programas para CAD, a partir da estrutura proposta ou de imagens de ressonância magnética ou tomografia computadorizada. Tal programa se comunica com o sistema de controle e automação da impressora 3D, traduzindo os dados computacionais de cada camada crosseccional do modelo no preenchimento físico do polímero utilizado no molde impresso (TURNBULL *et al.*, 2018).

Um aspecto interessante do desenvolvimento da impressão 3D mediada por CAD é a interface biológica – computacional – físico - estrutural deste processo. A tradução da estrutura biológica para a linguagem computacional (por meio da análise e processamento de imagens) permite a integração de estudos *in silico* por modelos baseado em agentes no processo de fabricação do enxerto para engenharia de tecidos, conforme exemplificado na Figura 4. Além da vantagem de se obter modelos computacionais da arquitetura do *scaffold* de modo rápido e representativo (quando comparado com a abordagem de modelagem por CAD) a partir da análise e processamento de imagens (GIANNITELLI *et al.*, 2014), este processo permite prever as propriedades biofísicas e biomecânicas do *scaffold* e o desempenho do desenvolvimento do tecido a partir de simulações de um modelo dinâmico baseado em agentes



que interagem com o *scaffold* recriado computacionalmente. A utilização de métodos de *machine learning* poderia inclusive resultar em uma estrutura otimizada do *scaffold* – baseado nas propriedades desejadas para o tratamento da lesão/anomalia - a ser impresso para o preparo do tecido a ser implantado.

Figura 4 – Representação da integração de modelos baseados em agentes no desenvolvimento de tecidos



Fonte: Adaptado por Willer Ferreira da Silva Junior, 2020, a partir das representações descritas por Giannitelli *et al.* (2014) e Shkarin *et al.* (2019).

Há, por outro lado, técnicas computacionais de concepção de estruturas de *scaffold* não baseadas em análises de imagens, cujos modelos de arquitetura resultantes podem ser transferidos para a interface de controle de impressoras 3D. Dinis e colaboradores (2014), por exemplo, utilizaram as funções hiperbólicas que descrevem as superfícies hiperbólicas paramétricas Schwartz P, Schwartz D, Gyroid, Neovius e W (iWP) como banco de dados no desenvolvimento de um software de código aberto programado em Python, para geração de superfícies mínimas triplamente periódicas. De modo interativo, o usuário pode selecionar o tipo de superfície e sua porosidade e posteriormente exportar o arquivo em formato STL para uso em impressoras 3D.

Almeida e Bártolo (2014) avaliaram - por meio do método dos elementos finitos com o software Abaqus - o efeito da espessura e raio dos *lattices* na porosidade e comportamento

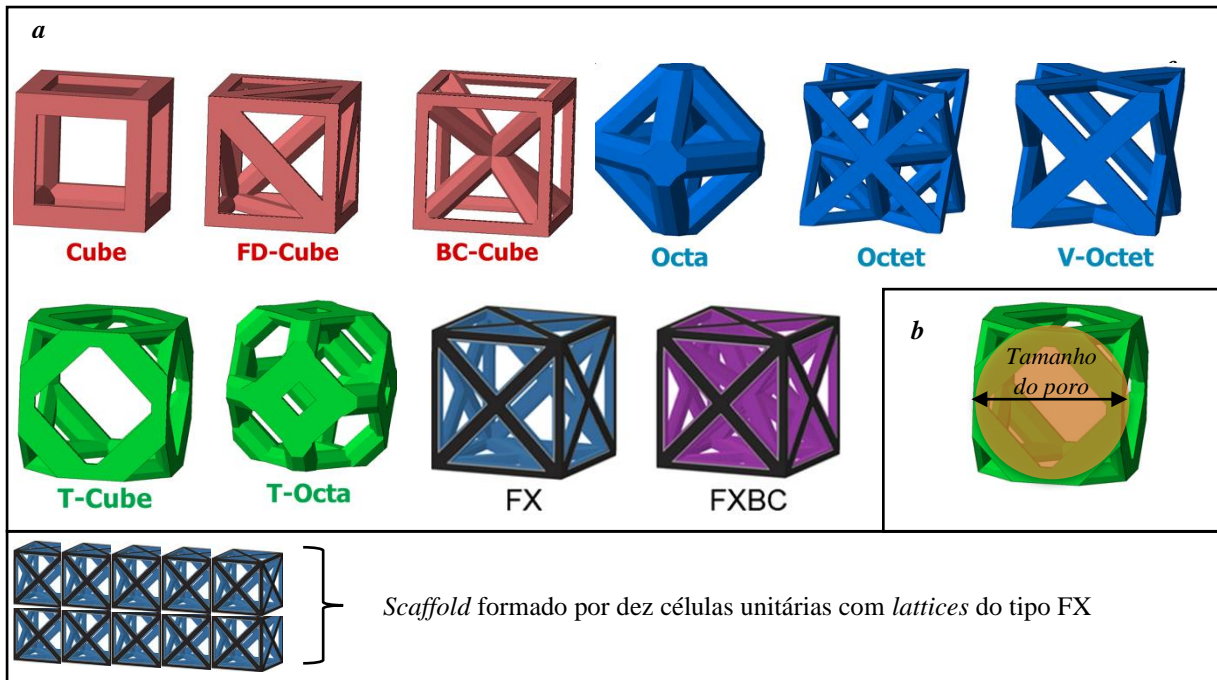
mecânico de *scaffolds* projetados a partir das superfícies mínimas triplamente periódicas de Schwarz e Schoen's I-WP, considerando como material constituinte, módulo de elasticidade e coeficiente de Poisson do material o poli(-caprolactona) (PCL), 400 MPa e 0,33, respectivamente. Em linhas gerais, para ambas as superfícies, o aumento da espessura da estrutura reduz a sua porosidade e aumenta o seu módulo de elasticidade. Entretanto, para a geometria de Schwarz, o aumento do raio do *lattice* reduz a porosidade até um ponto limite, a partir do qual a porosidade volta a aumentar, enquanto o módulo de elasticidade cai exponencialmente.

Kapfer e seus co-autores (2011) comparam as propriedades mecânicas de dois tipos de arquiteturas de *scaffold* a uma fração de volume sólido de 50%: sólidos de rede de superfície mínima e sólidos de folha de superfície mínima. A análise de tais propriedades foi feita utilizando-se o método dos elementos finito, considerando como material constituinte um sólido isotrópico linear-elástico. Os resultados mostraram que sólidos de folha de superfície mínima apresentam área de superfície e propriedades mecânicas superiores à arquitetura de sólidos de rede de superfície mínimas nas diferentes variações de superfícies (Gyroide, Diamond, Primitive, Fischer Koch, Manta g).

Egan, Shea e Ferguson (2018) apresentam um método de avaliação de propriedades mecanobiológicas e crescimento celular de *scaffolds* de diferentes estruturas de *lattices* baseados em feixes, como forma de otimização dessas estruturas, de modo a encontrar pontos de convergência entre propriedades de relações opostas (por exemplo, porosidade e resistência). Tais *lattices* são representados computacionalmente por células unitárias com diferentes configurações de feixes, sendo que o *scaffold* é o conjunto dessas células unitárias, o qual pode ser posteriormente impresso por impressão 3D para estudos *in vitro*.

Nesse trabalho, Egan, Shea e Ferguson (2018) estudaram as estruturas de poros denominadas cubo, FX, BC e FXBC (Figura 5), as quais possuem diferentes densidades de treliças, sendo o tamanho do poro considerado a menor área planar vazia. Neste modelo computacional, o crescimento celular é representado pela transição de voxels do estado de interface para tecido, o qual ocorre (em cada unidade de tempo  $dt$ ) quando suas curvaturas são maiores que 0, sendo que tal método de simulação de crescimento celular se baseia em resultados experimentais que relatam o efeito da concavidade de superfícies para o desenvolvimento de tecidos.

Figura 5 - Representação das estruturas de poros do tipo Cubo, FX, FD, BC, FXBC, Octa, Octet, V-Octet, T-Cubo e T-Octa



Fonte: Adaptado por Willer Ferreira da Silva Junior, 2021, a partir das representações descritas por Egan, Shea e Ferguson (2018), e Egan e colaboradores (2017). Na região *a* da figura, são ilustradas as estruturas topológicas de poros descritas pelos autores; a ilustração da região *b* da figura mostra como o tamanho do poro é determinado pelos autores (o maior diâmetro de uma esfera alocada entre os feixes da célula unitária), enquanto a porosidade é determinada pelo espaço vazio (volume cúbico – volume ocupado pelos feixes da célula unitária) do *lattice* dividido pelo seu volume cúbico; já a ilustração da região *c* da figura mostra como o *scaffold* descrito pelos autores é formado a partir do empilhamento de várias células unitárias de topologia definida.

Considerando células unitárias com comprimento máximo de 2000  $\mu\text{m}$ , feixe variando de 100 a 1000  $\mu\text{m}$ , e uma arquitetura cúbica, os autores constataram que culturas de células em 2D preenchem os espaços vazios mais rapidamente que em estruturas 2,5D e 3D. Além disso, foi verificado que o tempo necessário para o preenchimento dos espaços vazios é proporcional ao tamanho dos poros da arquitetura e que o decaimento da porosidade do *scaffold* é muito maior quando os feixes são mais largos, para células unitárias de comprimento constante (EGAN; SHEA; FERGUSON, 2018).

Quando as estruturas cubo, FX, BC e FXBC são comparadas, a cúbica é capaz de manter maior porosidade e tamanho de poro quando a espessura dos feixes é aumentada. Por outro lado, as razões curvatura-superfície e superfície-volume das estruturas FX, BC e FXBC são consideravelmente maiores que as da cúbica quando a porosidade é aumentada, levando o tecido a se desenvolver mais rapidamente nessas estruturas. Já o parâmetro permeabilidade é reduzido, reiterando a relação de oposição entre tais variáveis (EGAN; SHEA; FERGUSON, 2018).

Egan e colaboradores (2017), estudaram as propriedades morfológicas (porosidade, tamanho de poro e razão superfície-volume), mecânicas (módulo de elasticidade e módulo de cisalhamento) e fluidodinâmicas (permeabilidade) das estruturas das famílias de *lattices* cúbico, octaédrico, e truncado, para escolha de modelos adequados para o desenvolvimento de tecido ósseo, com aplicação em gaiola de fusão intercorpo espinhal. Para tal aplicação, o *scaffold* deve ser capaz de suportar diferentes tipos de tensões em várias regiões (durante extensão espinhal, flexão, dobra e rotação), assim como proporcionar condições de crescimento celular para o desenvolvimento ósseo.

Em linhas gerais, após a seleção de um tipo de topologia de *lattice* e seu tamanho ( $L$ ), a espessura de suas arestas foi especificada definindo a porosidade (ou densidade) e tamanho dos poros do *scaffold* de estruturas periódica. O módulo de elasticidade e de cisalhamento dos *scaffolds* foram calculados no software Abaqus pelo método dos elementos finitos, aplicando um deslocamento unidirecional de  $0,01 * L$  (unidade de comprimento) em todos os nós a partir de uma das faces do cubo constituído de 125 células unitárias; a permeabilidade dos *scaffolds* foi calculada pela equação de Darcy, resolvendo a equação de Navier-Stokes por meio do método de volumes finitos no software ANSYS para *lattices* contendo 27 células unitárias. Os autores constataram que o tamanho dos poros cresce exponencialmente com a porosidade, sendo a topologia BC a de maior poro e a FD a de menor poro. Por outro lado, a razão superfície-volume cai exponencialmente com o aumento do tamanho dos poros (variados entre 250  $\mu\text{m}$  a 1500  $\mu\text{m}$ ), a um valor de porosidade constante. A estrutura cúbica apresentou menor superfície-volume e módulo de cisalhamento relativo, enquanto também apresentou maior módulo de elasticidade, por possuir feixes na direção da carga aplicada aos nós (EGAN *et al.*, 2017).

Técnicas de simulação e fabricação de estruturas não periódicas e de poros heterogêneos são descritas por Velasco, Lancheros e Garzón-Alvarado (2016) e por Nyberg, O'Sullivan e Grayson (2019). Nyberg, O'Sullivan e Grayson desenvolveram um algoritmo de cortes no MATLAB, denominado scafSLICR, para criação de *scaffold* com padrão de poro cruzado cúbico. O software permite a variação da estrutura pela alteração do espaçamento entre fibras ou da altura e largura dos suportes por meio das fibras adjacentes e sobrepostas, permitindo a criação de microestruturas e variação da porosidade ou tamanho do poro. Os resultados originados do software permitem a validação do modelo antes da sua conversão para GCODE e impressão em impressoras 3D e demonstraram que o software é capaz de simular estruturas cúbicas complexas e heterogêneas em diferentes escalas para a impressão de *scaffold*.

Velasco, Lancheros e Garzón-Alvarado (2016) ressaltam a importância do estudo e simulação de estruturas heterogêneas de *scaffold*, principalmente quando se trata de aplicações

para a reconstituição de tecido ósseo; nessas situações, a resposta de estruturas homogêneas e periódicas a tensões diverge das respostas encontradas para arcabouços heterogêneos (como é o caso da configuração fisiologicamente natural do organismo) e tais estruturas homogêneas apresentam fraturas catastróficas, não observadas em arquiteturas heterogêneas. Tal heterogeneidade pode ser encontrada em superfícies representadas pela geometria fractal ou por modelos de reação-difusão, como proposto por Alan Turing.

Os autores utilizaram o modelo de reação-difusão de Schnakenberg para gerar os padrões de poros nas estruturas selecionadas; em seguida, a malha FEM foi convertida em formato STL para sua posterior impressão por sistema de jateamento, no equipamento Object Eden 260, utilizando-se uma substância (Fullcure RGD720) de propriedades similares a de biomoléculas (LANCHEROS; GARZÓN-ALVARADO, 2016).

As estruturas foram construídas pela solução das equações pelo FEM, utilizando-se a técnica de Newton-Raphson no FORTRAN, com as seguintes características: uma arquitetura cúbica com 3 mm de comprimento e uma malha de 46.656 nós e 42.875 elementos; uma cilíndrica de raio de 1,5 mm e 3,0 mm de altura com malha de 36.312 nós e 33.462 elementos; uma cunha de 4 mm de comprimento e 3 mm de largura com uma malha de 29.791 nós e 27.000 elementos. A medição das propriedades morfológicas e mecânicas dos *scaffolds* mostrou uma variação considerável no módulo de elasticidade entre os eixos x, y e z e valores de rugosidade e concavidade divergentes do esperado pelo modelo, provavelmente devido às características do método de impressão selecionado (LANCHEROS; GARZÓN-ALVARADO, 2016).

## 2.5 MODELAGEM BASEADA EM AGENTES E AUTÔMATOS CELULARES NA CULTURA DE CÉLULAS E DE TECIDOS

Dentre os diversos sistemas que podem ser representados pela aplicação da modelagem baseada em agentes, os sistemas biológicos têm sido recentemente estudados por meio da modelagem baseada em agentes, resultando em novas possibilidades de pesquisa e desenvolvimento da biologia. Glen, Kemp e Voit (2019) ilustram brilhantemente os benefícios do uso da modelagem baseada em agentes no estudo da morfogênese em tecidos, por exemplo. De acordo com os autores, tal técnica possibilita a integração dos princípios dos modelos de Reação-Difusão (RD), proposto por Alan Turing, e de Informação Posicional (IP), desenvolvido por Lewis Wolpert.

Enquanto o RD baseia-se na solução de equações diferenciais parciais de reações não lineares de diferentes componentes celulares com difusividades distintas, o modelo IP

(tipicamente qualitativo) visa definir os limiares a partir dos quais a célula interpreta as condições do ambiente imediato (presença de moléculas sinalizadoras, concentração de nutrientes, dentre outras) de modo específico. Ambos os modelos demonstram a formação de padrões de comportamento celular a partir de regras simples (GLEN; KEMP; VOIT, 2019).

A partir de recursos computacionais, a MBA permite a criação de múltiplos agentes (células, moléculas, estruturas celulares) que reagem e se movimentam de diferentes formas; tais agentes também podem ser dotados de status diversos e responderem sistematicamente às condições encontradas no microambiente em seus entornos, gerando padrões de comportamento coletivo dinâmicos e espaço-temporais. Segundo Glen, Kemp e Voit (2019), a escolha de representação de uma entidade como um agente depende da sua capacidade de replicar as regras que representam as unidades do sistema, o que é determinado pela escala temporal predominante do modelo. No caso de células, esses agentes são geralmente representados como *lattices* que se movimentam e interagem com a vizinhança de von Neuman ou de Moore, *cellular potts* – cluster de pontos de uma malha com a mesma identificação e que se movimentam de acordo com cálculos de energia da célula – e esferas incompressíveis/centróides, as quais podem se movimentar livremente pelo ambiente.

Dados os avanços dessa técnica, a MBA tem sido usada no estudo do papel da proliferação, migração e diferenciação na morfogênese de tecidos. Alguns exemplos dessas aplicações incluem: 1) modelos de invasão celular em rede 2D, nos quais células idênticas e de mesma taxa de crescimento movimentam-se em caminhadas aleatórias pelas regiões vacantes da rede, ocasionando a predominância de células oriundas de poucas células da população inicial (*superstars*); 2) modelos de criptas (como as criptas de Lieberkühn) desenvolvidos em malha 2D, onde informações posicionais do gradiente chamado “Divide and Die” - o qual representa um gradiente de moléculas sinalizadoras ao longo da cripta - induzem as células que se deslocam ao longo desse gradiente a migrar do estado quiescente para o de proliferação ou morte celular; 3) modelos baseados em agente contendo células progenitoras bipotentes, células terminais basais, e células terminais luminais em uma malha 2D no estudo do papel da proliferação e diferenciação celular nas alterações de glândulas mamárias expostas ao fator de crescimento  $\beta$  e à radiação ionizante (GLEN; KEMP; VOIT, 2019).

Além do fato dos modelos acima tentarem representar os respectivos sistemas biológicos em uma rede 2D e 3D, os agentes se movimentaram e se multiplicaram ao longo das estruturas reticulares vacantes, o que torna os modelos influenciáveis pelo volume de exclusão das células na rede, fazendo com que mitoses aconteçam apenas nas bordas dos agrupamentos celulares. A representação dos sistemas celulares em malhas (*lattice*) também possibilita que

forças mecânicas sejam levadas em consideração, as quais possuem especial importância para células aderentes (GLEN; KEMP; VOIT, 2019).

Sun e colaboradores (2008) desenvolveram um modelo baseado em agentes de co-cultura de queratinócitos e fibroblastos na plataforma FLAME para estudar o papel do soro fetal bovino (SFB) e dos fibroblastos na formação de colônias de queratinócitos. Esse estudo possui grande relevância para a área, uma vez que visou o desenvolvimento de novas hipóteses sobre a cultura de queratinócitos, para superação do uso de SFB e fibroblastos murinos letalmente irradiados (protocolo utilizado desde o século 20) para atender os requisitos de transplante de células e tecidos.

Nesse trabalho, as regras de comportamento dos fibroblastos e queratinócitos foram definidas a partir da extensa literatura sobre tais linhagens celulares e podem ser resumidas pela seguinte sequência: 1) envio da localização e tipo de célula para um repositório de dados dos agentes, 2) ciclo celular e regras de proliferação, 3) regras de diferenciação, 4) regras de migração, 5) regras físicas. Na etapa 2 do modelo, cada célula verifica a densidade celular em sua vizinhança e caso ela seja menor que o limite definido, ela entra em G0; nas próximas interações, caso a densidade permaneça abaixo do limite, a célula inicia o seu ciclo celular, caso contrário ocorre diferenciação celular (SUN *et al.*, 2008).

Outras circunstâncias também estimulam a diferenciação celular, tais como a presença de SFB, ceramida ou Fas-L no entorno e o contato queratinócito-fibroblasto proliferativo. Entretanto, nesse modelo foi explorado o efeito do contato queratinócito-fibroblasto proliferativo; para tal, os fibroblastos foram modelados com adesão à matriz extracelular menor que os queratinócitos e ambos se deslocam tanto passivamente (devido à mitose) quanto ativamente, a uma velocidade de 1  $\mu\text{m}/\text{min}$ . Finalmente, fibroblastos morrem por apoptose na ausência de SFB e quando não estão aderidos à MEC. Os experimentos *in silico* foram realizados partindo de 10 queratinócitos e um número variável de fibroblastos (10 a 50) dispostos em uma placa de 500 x 500  $\mu\text{m}$  (SUN *et al.*, 2008).

Os resultados mostraram que a taxa de crescimento de colônias de queratinócitos é altamente influenciada pela proporção entre fibroblastos e queratinócitos, devendo essa razão ser ótima no início da co-cultura, o que possibilita a cultura de queratinócitos sem a suplementação com SFB. Além disso, fibroblastos não mutados quanto à capacidade de proliferação seriam mais eficazes no crescimento das colônias de queratinócitos do que as células irradiadas, tradicionalmente utilizadas nos protocolos, sendo que a quantidade e taxa de proliferação dessa linhagem determinam a velocidade de confluência de queratinócitos. Quando comparadas as imagens da animação do modelo com as fotos de microscopia, os perfis de

formação de colônias e disposição das células se mostraram bastante similares, tanto nos cenários de cultura isolada e co-cultura, nas condições de ciclo celular variando de 0 a 30 h, probabilidade de divisão celular dos fibroblastos de 0 a 90%, taxa de diferenciação de 0 a 100% e taxa de migração de 0 a 1  $\mu\text{m}/\text{min}$  (SUN *et al.*, 2008).

Um resumo de modelos baseado em agentes (incluindo autômatos celulares) desenvolvidos para o estudo de culturas de células e de tecidos é apresentado na Tabela 6 (APÊNDICE A).

A partir dos estudos disponíveis na literatura, é possível perceber que os autores geralmente se concentram em um grupo de comportamentos celulares relacionados, calculam o gradiente de concentração de nutrientes pela solução de equações diferenciais em função da densidade celular ao longo do espaço de interação dos agentes (sem considerar o efeito *feedback* desta relação) e desconsideram a interação célula – matriz/*scaffold*. Em alguns desses trabalhos, podem ser percebidos os benefícios da aplicação da modelagem baseada em agentes e autômatos celulares no estudo de comportamento de células e tecidos, uma vez que eles têm proporcionado a visualização de emergência de fenômenos coletivos outrora restringidos em modelos de campo médio.

Entretanto, embora a avaliação de sistemas biológicos de modo estratificado seja comum, é possível que o grau de complexidade do sistema seja reduzido e que outros fenômenos emergentes oriundos da convergência e interação das diferentes regras do sistema não sejam observados em modelos que abordam apenas regras similares de comportamentos celulares, ou que excluem comportamentos fundamentais, tais como apoptose e interações do tipo célula-*scaffold*, célula-célula e célula-MEC.

Portanto, torna-se necessário o desenvolvimento de um modelo que abarque os comportamentos fundamentais das células em resposta ao ambiente tridimensional que as circundam, possibilitando a análise do sistema biológico, no contexto da engenharia de tecidos, enquanto sistema complexo.



### 3 OBJETIVO GERAL

- Avaliar aspectos importantes da cultura de células 3D pela perspectiva da ciência de sistemas complexos, realizando a interlocução entre as áreas, por meio do desenvolvimento de um modelo baseado em agentes como plataforma base de experimentação *in silico* de engenharia de tecidos cartilaginoso e ósseo;

#### 3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar os parâmetros de cultura de células (p. ex., concentração de nutrientes, taxa de perfusão, concentração do inóculo, porosidade do *scaffold*, dentre outros) do modelo cujos efeitos possuem maior relevância para a cultura de células aderentes 3D em *scaffold*;
- Identificar fenômenos emergentes não descritos na literatura;
- Identificar padrões de resposta no desenvolvimento de tecidos;
- Caracterizar o modelo desenvolvido e os sistemas biológicos modelados quanto a sua complexidade energética;

## 4 MÉTODOS

O modelo computacional deste trabalho foi desenvolvido em Python (versão 3.7.6) no editor de códigos VS Code, por meio de funções básicas e pacotes específicos do Python, tais como `matplotlib`, `numpy`, `random`, `mpl_toolkits.mplot3d`, `statistics`, `matplotlib.ticker`, `matplotlib.animation`, `pandas`, `math` and `seaborn`, em suas versões mais atuais e/ou compatíveis com a versão do Python. Tais pacotes e funções possibilitam o desenvolvimento de modelos com variáveis aleatórias que mimetizam sistemas de múltiplos agentes em escala tridimensional, por meio da definição de regras de comportamento e decisão dos agentes do sistema e análises gráficas diversas.

O programa desenvolvido para o modelo, possui dois eixos estruturais que se comunicam e interagem por meio das regras de decisão dos agentes e as relações de dimensão espacial definidas para o modelo (APÊNDICE B): a) algoritmo de construção e avaliação das propriedades do *scaffold* e b) algoritmo de construção dos agentes e suas regras de comportamento.

Ao longo das simulações realizadas por meio do modelo construído, foram adotados valores experimentais para parâmetros do *scaffold* (p. ex., módulo de elasticidade do material de construção do *scaffold*), das células (p. ex., diâmetro e volume de condrócito, tempo de duplicação celular, dentre outros) e condições de cultivo (p. ex., taxa de alimentação de glicose, pressão parcial de O<sub>2</sub>, dentre outros). Os valores de parâmetros celulares foram obtidos preferencialmente do banco de dados BioNumbers (MILO *et al.*, 2010) e são referenciados ao longo do texto pelo identificador (BNID) do parâmetro no banco de dados. Parâmetros de *scaffold* e de condições de cultivo foram obtidos de artigos científicos pesquisados na literatura especializada, os quais são referenciados quando utilizados. Dados moleculares foram obtidos de bancos de dados PubChem (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION – NCBI, 2021) e são referenciados pelos seus indicadores (CID) específicos.

O modelo desenvolvido neste trabalho foi executado no VS Studio Code, em um computador ideapad 330-15IKB, com processador Intel(R) Core (TM) i3-7020U CPU @ 2.30GHz, 4GB de memória RAM e sistema operacional de 64 bits (Windows 10). Com o objetivo de se obter melhor desempenho do programa e melhor utilização do esforço computacional para a simulação do comportamento do agente responsável pela função do sistema (CLARK; JACQUES, 2012), o número de agentes do tipo molécula, bem como os parâmetros a eles relacionados (p. ex., concentração crítica de oxigênio – hipoxia -, limite inferior crítico de glicose, limite superior crítico de lactato, etc) foram divididos pelo fator de

redução de  $10^{10}$ . A utilização deste fator de redução viabiliza a simulação da interação de um número computável de agentes sem impactar os critérios de decisão dos agentes (p. ex., concentração crítica de oxigênio) estabelecidos experimentalmente. O APÊNDICE B lista e classifica todas as variáveis do modelo, assim como descreve a relação entre elas e os valores adotados quando o fator de redução é utilizado.

#### 4.1 ALGORITMO DE CONSTRUÇÃO E AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES DO SCAFFOLD TRIDIMENSIONAL

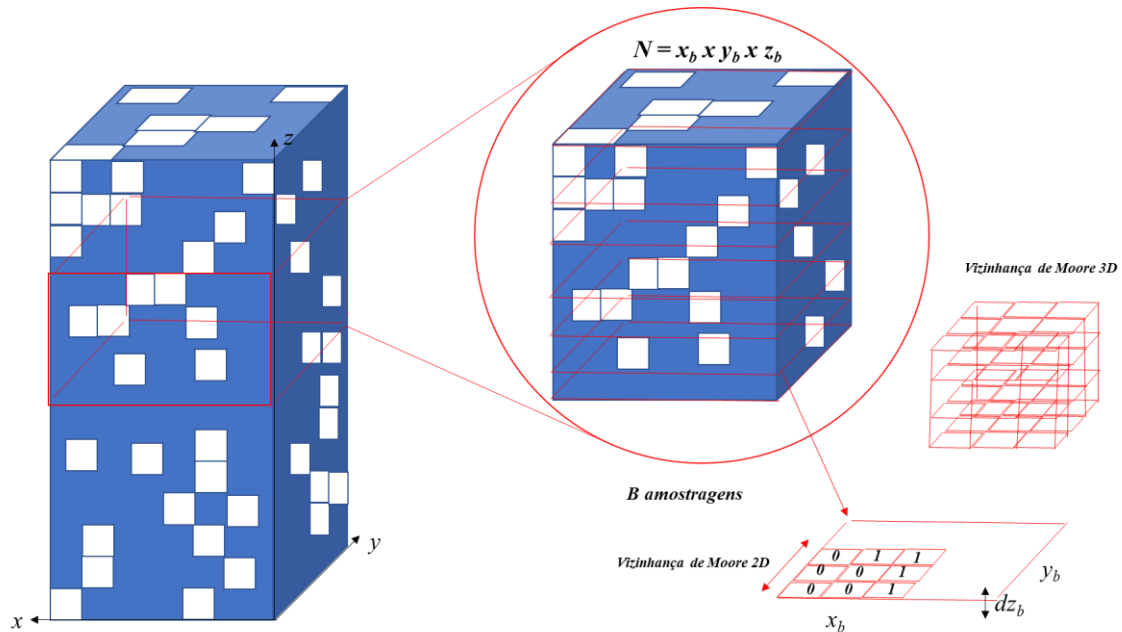
O programa cria um *scaffold* de geometria hexaédrica de dimensões  $x_{max}$  (comprimento),  $y_{max}$  (largura) e  $z_{max}$  (altura) variáveis – determinadas pelo usuário para as condições escolhidas para a simulação, cujas coordenadas possuem, inicialmente, valores iguais a 0 (para toda coordenada no espaço tridimensional  $x, y, z$ ), o qual representa o espaço vazio do *scaffold*, ou poro. Para cada valor teórico de porosidade, o programa muda o valor de  $A$  coordenadas de 0 para 1 – selecionadas por amostragem aleatória sem reposição, ou seja, uma coordenada nunca é escolhida mais de uma vez –, onde  $A$  é calculado pela equação 1:

$$A = (x_{max}).(y_{max}).(z_{max}).(1 - \text{porosidade}) \quad (1)$$

O valor 1 representa a ocupação do espaço da coordenada pela massa do material do *scaffold* (Figura 6) e cada coordenada do *scaffold* corresponde a uma fração cúbica (voxel) do arcabouço.

A caracterização do *scaffold* hexaédrico foi feita pelo cálculo do intervalo de estabilidade (ver item 4.4) dos parâmetros porosidade, tamanho dos poros, permeabilidade e módulo de elasticidade. A partir do espaço discreto do hexaedro construído, 100 amostragens ( $B$ ) de tamanho  $N$  (correspondente às coordenadas  $x_b, y_b, z_b$  da amostra) são realizadas em alturas aleatórias no eixo  $z$  (Figura 6), sendo que a cada amostragem, as propriedades porosidade, tamanho dos poros, permeabilidade e módulo de elasticidade foram calculadas para as amostras, conforme descrito nas equações abaixo.

Figura 6 - Representação do scaffold (população de dados), *bootstrapping* ( $B$  amostragens de tamanho  $N$ ) e vizinhança de Moore (2D e 3D) utilizados para o cálculo do tamanho de poros e demais parâmetros



Fonte: Elaborado por Willer Ferreira da Silva Junior, 2020. A região azul representa as coordenadas de valor igual a 0, enquanto a branca representa as coordenadas de valor igual a 1. O hexaedro à esquerda representa o *scaffold* gerado pelo algoritmo de acordo com os dados de entrada do usuário, com o qual os agentes interagem, enquanto a fração representada pela imagem expandida (*zoom*) corresponde à amostra de tamanho  $N$  do *scaffold* (retirada  $B$  vezes), utilizada para o cálculo do intervalo de estabilidade dos parâmetros de caracterização do *scaffold* pelo método de *bootstrapping*.

$$p = \frac{\text{n}^\circ \text{ de coordenadas da amostra cujo valor é } 0}{N} \quad (2)$$

$$N = x_b \cdot y_b \cdot z_b = x_b \cdot y_b \cdot (z_{final} - z_{inicial}) \quad (3)$$

Onde  $P$  é a porosidade,  $N$  é o número de voxels presentes no bloco amostrado, e  $z_b$  é representado pela diferença entre a posição final da amostra no eixo  $z$  do *scaffold* ( $z_{final}$ ) e sua posição inicial no mesmo eixo ( $z_{inicial}$ ), sendo que  $z_{inicial} \geq 0$  e  $z_{final} \leq z_{max}$ .

$$\Phi = [\text{n}^\circ \text{ de "0" em uma vizinhança de Moore 2D} (r = 1 \text{ ou } 2)]. d \quad (4)$$

Onde  $\Phi$  é o tamanho dos poros ( $\mu\text{m}$ ),  $d$  é o comprimento (em  $\mu\text{m}$ ) de um dos lados da célula unitária 2D.

$$k = K \cdot P^3 / (S/V)^2 \quad (5)$$

$$S = [\sum_{i=0}^n 6 - \text{n}^\circ \text{ de vizinhança "0" de cada voxel vazio } (i)]. a \cdot 10^{-6} \quad (6)$$

$$V = N \cdot v \cdot 10^{-9} \quad (7)$$

Onde  $k$  é a permeabilidade ( $m^2$ ),  $K$  é o coeficiente empírico de proporcionalidade da relação de Kozeny–Carmen,  $S$  ( $mm^{-1}$ ) é a área total da superfície dos poros,  $i$  representa cada voxel de valor igual a 0,  $N$  é o número total de voxels igual a “0” dentro do bloco amostrado do *scaffold*,  $a$  ( $\mu m^2$ ) é a área de cada face do voxel,  $V$  é o volume nominal do bloco amostrado e  $v$  é o volume de cada voxel ( $\mu m^3$ ). A Figura 7 ilustra o método utilizado para calcular a área de superfície do bloco amostrado e o tamanho dos poros.

A equação 4 é utilizada para calcular o tamanho do poro de área de dimensões iguais a de uma vizinhança de Moore no plano  $xy$  ao longo do eixo  $z$  da amostra, de modo similar ao método descrito por Egan e colaboradores (2017). Para o cálculo de permeabilidade, o valor de  $K$  foi adotado como  $2,75 \times 10^{-7}$ , conforme reportado nos estudos de Egan e colaboradores (2017; 2018) para topologias cúbicas.

No que tange a propriedade mecânica do *scaffold*, o módulo de elasticidade apresenta uma relação de proporcionalidade inversa com a porosidade da estrutura, relativamente homogênea em geometrias diferentes para um mesmo material (CHUAN; HOQUE; PASHBY, 2013). Dessa forma a rigidez do *scaffold* para diferentes níveis de porosidade foi calculada pela equação 8:

$$\frac{E^*}{E_s} = C(1 - P)^\eta \quad (8)$$

Onde  $E^*$  é o módulo de elasticidade efetivo do *scaffold*,  $E_s$  é o módulo de elasticidade do material sólido constituinte do *scaffold*,  $C$  é uma constante de proporcionalidade empírica e  $\eta$  é uma constante de potência específica do material do *scaffold* na correlação do módulo de elasticidade com a porosidade e  $P$  é a porosidade da estrutura. Nesse trabalho, foi adotado o valor de  $\eta = 2$  e  $C = 1$  (SCAGLIONE *et al.*, 2014), uma vez que em porosidades acima de 70% os valores estimados pela equação apresentam maior exatidão (GUARINO; CAUSA; AMBROSIO, 2007).

A caracterização da arquitetura dos *scaffolds* gerados foi realizada variando a porosidade, material de fabricação do *scaffold* e comprimento da célula unitária, conforme descrito na Tabela 1.

Tabela 1 - Variáveis de entrada na caracterização de *scaffold*

Variáveis dependentes	Variáveis independentes	Valor adotado	Referência/ Comentário
A	$x_{max}$	12	N/A
	$y_{max}$	12	N/A
	$z_{max}$	1000	N/A
	P	Variado de 10 a 90%	N/A
P	N	12 x 12 x 100	São adotados $x_b = x_{max}$ , $y_b = y_{max}$ e $z_b = 100$ , de modo a tornar o tamanho da amostra = 10% da população
$\Phi$	d	Variado de 20 a 100 $\mu\text{m}$ <sup>1</sup>	BNID 105692
k	K	$2,75 \times 10^{-7}$	EGAN <i>et al.</i> , 2017; 2018
	P	Variado de 10 a 90%	N/A
	S	N/A	Calculado de acordo com a amostra retirada e P
	V	N/A	Calculado de acordo com a amostra retirada
S	a	Variado de 40 a 10000 $\mu\text{m}^2$ <sup>2</sup>	N/A
V	N	12 x 12 x 100	São adotados $x_b = x_{max}$ , $y_b = y_{max}$ e $z_b = 100$ , de modo a tornar o tamanho da amostra = 10% da população
	v	Variado de 8000 a $1 \times 10^6$ $\mu\text{m}^3$ <sup>2</sup>	N/A
E*	$E_s$	Variado de 1 a 500 MPa <sup>3</sup>	WASYŁECZK; SIKORSKA; CHWOJNOWSKI, 2020; KOH <i>et al.</i> , 2019; LIU; WEBSTER, 2016; IATRIDIS <i>et al.</i> , 2003; QU <i>et al.</i> , 2014; GHASSEMI <i>et al.</i> , 2018; KIM <i>et al.</i> , 2017; KIM <i>et al.</i> , 2019
	C	1	SCAGLIONE <i>et al.</i> , 2014
	P	Variado de 10 a 90%	N/A
	$\eta$	2	SCAGLIONE <i>et al.</i> , 2014; GUARINO; CAUSA; AMBROSIO, 2007

Fonte: Willer Ferreira da Silva Junior, 2021. N/A: Não aplicável. Os valores adotados se referem às variáveis independentes.

<sup>1</sup>20  $\mu\text{m}$  foi escolhido como comprimento mínimo de uma célula unitária para que esta comporte ao menos uma célula de tecido conjuntivo (p. ex., diâmetro de um fibroblasto arredondado:  $14 \pm 2$   $\mu\text{m}$ ).

<sup>2</sup> Derivado da faixa do diâmetro adotado para as células unitárias 2D (20 a 100  $\mu\text{m}$ ).

<sup>3</sup> O módulo de elasticidade de materiais varia não só com a composição do material, mas também com o método de fabricação do *scaffold*. Portanto, foi adotada uma faixa ampla de  $E_s$  que abranja diferentes tipos de materiais.

Figura 7 - Representação dos algoritmos de cálculo de área de superfície (S) e tamanho de poro (Φ)

### Cálculo de S (mm<sup>-1</sup>)

void = [ [x<sub>0</sub>,y<sub>0</sub>,z<sub>0</sub>], [x<sub>1</sub>,y<sub>1</sub>,z<sub>1</sub>] ..., [x<sub>n</sub>,y<sub>n</sub>,z<sub>n</sub>] ] #Lista de coordenadas de voxels cujo valor é 0



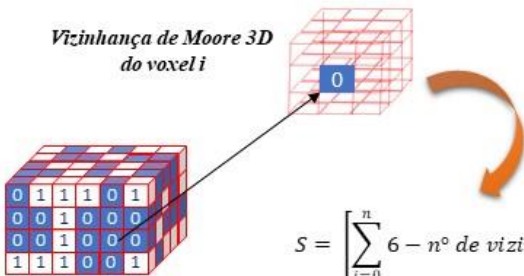
$$a_{\text{voxel } i=0} = 6 * \text{área de cada face} = 6.d^2$$



$$a_{\text{total}} = a_{\text{voxel } i=0} + a_{\text{voxel } i=1} - \text{número de faces compartilhadas} = 2.(6.d^2) - 1$$

Para cada [x<sub>i</sub>,y<sub>i</sub>,z<sub>i</sub>] = 0, sua vizinhança de Moore 3D é verificada em busca de faces compartilhadas por voxels vazios (igual a 0)

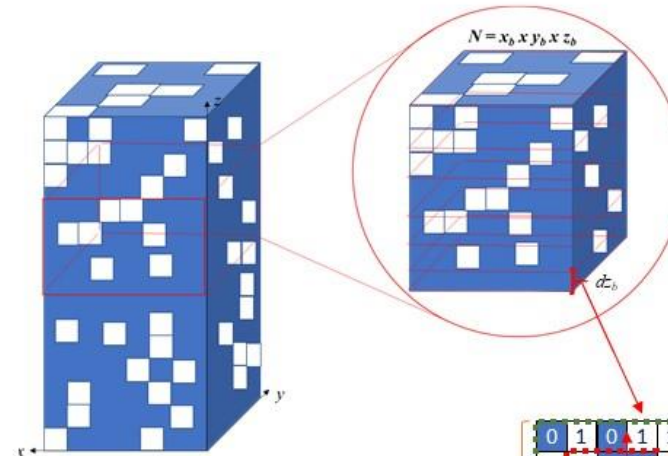
Vizinhança de Moore 3D do voxel i



$$S = \left[ \sum_{i=0}^n 6 - n^{\circ} \text{ de vizinhança "0" de cada voxel vazio (i)} \right] . a$$

### Cálculo do Φ (μm)

void = [ [x<sub>0</sub>,y<sub>0</sub>,z<sub>0</sub>], [x<sub>1</sub>,y<sub>1</sub>,z<sub>1</sub>] ..., [x<sub>n</sub>,y<sub>n</sub>,z<sub>n</sub>] ] #Lista de coordenadas de voxels cujo valor é 0



0	1	0	1	1	1
1	1	0	0	1	1
1	1	0	0	0	1
0	1	0	1	1	1
0	0	1	1	1	1

Vizinhança de Moore r=1

Vizinhança de Moore r=2

Para cada [x<sub>i</sub>,y<sub>i</sub>,z<sub>i</sub>] = 0, sua vizinhança de Moore 3D é verificada em busca de células unitárias vazias (igual a 0)

- Ao detectar uma célula vizinha = 0, a célula adjacente é verificada;
  - Caso ela seja = 0, 2 células vazias são contabilizadas
  - Caso ela seja = 1, apenas 1 célula vazia é contabilizada

0	1	0	1	1	1
1	1	0	0	1	1
1	1	0	0	0	1
0	1	0	1	1	1
0	0	1	1	1	1

p. ex: Φ (centrado em [x<sub>b</sub>,y<sub>b</sub>,z<sub>b</sub>]) = 7.d

## 4.2 ALGORITMO DE CONSTRUÇÃO DOS AGENTES E SUAS REGRAS DE COMPORTAMENTO

As moléculas de glicose, oxigênio, lactato, fatores de crescimento e as células, são considerados agentes do modelo, os quais são representados computacionalmente como listas de informações referentes a cada agente, como descrito abaixo:

*célula*  $_p = (x, y, z, \text{energia da célula}, \text{fase do ciclo celular}, \text{contador de deslocamento da célula}, \text{velocidade média}, \text{contador de tempo de permanência na fase do ciclo celular}, \text{indicador de catabolismo de glicose ou de lactato}, \text{volume da célula}, \text{tipo de célula (produtora ou não produtora de MEC)})$

*molécula de glicose*  $_p = (x, y, z, \text{contador de tempo de deslocamento}, \text{velocidade média})$

*molécula de oxigênio*  $_p = (x, y, z, \text{contador de tempo de deslocamento}, \text{velocidade média})$

*molécula de fator de crescimento*  $_p = (x, y, z, \text{contador de tempo de deslocamento}, \text{velocidade média})$

*molécula de lactato*  $_p = (x, y, z, \text{contador de tempo de deslocamento}, \text{velocidade média}, \text{posição original no eixo } z \text{ onde a molécula de lactato foi excretada})$

Onde  $x$ ,  $y$  e  $z$  representam as coordenadas da posição dos agentes no *scaffold* e  $p$  representa a posição do agente específico em seu respectivo conjunto (lista) de agentes, conforme descrito abaixo:

*Lista de células* = [*célula*  $_0$ , *célula*  $_1$ , *célula*  $_2$ , *célula*  $_3$ , ..., *célula*  $_p$ ]

*Lista de moléculas de glicose* = [*glicose*  $_0$ , *glicose*  $_1$ , *glicose*  $_2$ , *glicose*  $_3$ , ..., *glicose*  $_p$ ]

*Lista de moléculas de oxigênio* = [*oxigênio*  $_0$ , *oxigênio*  $_1$ , *oxigênio*  $_2$ , *oxigênio*  $_3$ , ..., *oxigênio*  $_p$ ]

*Lista de moléculas de fator de crescimento* = [*fator de crescimento*  $_0$ , *fator de crescimento*  $_1$ , *fator de crescimento*  $_2$ , *fator de crescimento*  $_3$ , ..., *fator de crescimento*  $_p$ ]



*Lista de moléculas de lactato = [lactato<sub>0</sub>, lactato<sub>1</sub>, lactato<sub>2</sub>, lactato<sub>3</sub>, ..., lactato<sub>p</sub>]*

Todos os agentes se deslocam somente por meio dos poros do *scaffold* – ou seja, os agentes só podem adotar coordenadas  $x$ ,  $y$ ,  $z$  cujo valor na estrutura tridimensional do *scaffold* é igual a 0. Isso implica que o espaço de deslocamento dos agentes é finito e limitado as dimensões máximas do *scaffold* ( $x_{max}$ ,  $y_{max}$ ,  $z_{max}$ ). Além disso, as moléculas possuem um fluxo ascendente (no caso de cultivo em perfusão) ou aleatório (no caso de cultivo em batelada, exceto as moléculas de oxigênio, as quais sempre possuem deslocamento ascendente), simulando os movimentos de moléculas nos dois tipos de cultura de célula.

Da mesma forma, as moléculas são distribuídas nos voxels vazios de modo aleatório (em  $t_m = t_n = 0$ ), ou são criadas (no caso de oxigênio e glicose, no regime de cultivo em perfusão) a uma taxa de alimentação  $\dot{n}$  (número de moléculas/minuto) nos voxels vazios da base do *scaffold* ( $z = 0$ ).

As moléculas de lactato, por outro lado, são criadas pelo programa em um dos quadrantes da vizinhança de Moore da célula que excreta o lactato durante a glicólise. As moléculas são removidas das listas de moléculas de glicose, oxigênio e lactato quando são consumidas por alguma célula, ou quando atingem o topo do *scaffold*, assim como ocorre nos cultivos em regime contínuo de tecido por perfusão. Nos cenários de cultivo celular em batelada, apenas as moléculas de oxigênio ascendem até o topo do *scaffold*, sendo que as demais moléculas (exceto as de fator de crescimento, as quais não são consumidas pelas células) só são removidas das listas de agentes quando são catabolizadas pelas células.

A velocidade linear média de cada molécula ( $u_{média,m,t_m}$ ) é atualizada a cada unidade de tempo  $t_m$  – tempo de dimensão molecular, ou minuto – conforme equação 9:

$$u_{média,m,t_m} = z_{m,t_m} / t_m \quad (9)$$

Onde  $z_{m,t_m}$  é a posição da molécula  $m$  no tempo  $t_m$  no eixo  $z$ , correspondente ao número de voxels ascendido pela molécula durante do período de tempo  $t = 0$  a  $t_m$ . Caso a molécula se encontre em um voxel contendo MEC (representado no modelo como uma coordenada  $x$ ,  $y$ ,  $z$  dos poros do *scaffold*, cujo valor é igual a 2), o número de voxels ascendido pela molécula é 1 unidade menor que quando tal molécula se encontra em um voxel vazio (cujo valor da coordenada  $x$ ,  $y$ ,  $z$  é igual a 0), representando a resistência à difusão das moléculas causada pelas substâncias presentes na matriz extracelular. O mesmo conceito foi adotado para calcular

a velocidade média das células, sendo que a velocidade de cada célula foi expressa, entretanto, como o número de voxels pelos quais ela se movimentou no tempo de escala celular ( $t_n$ ) multiplicado pelo comprimento do voxel ( $d$ ).

#### 4.2.1 Regras de comportamento das células

As células também são representadas por uma lista de variáveis e inicialmente distribuídas aleatoriamente pelos poros do *scaffold* – representativo de um cultivo celular *in vitro*. Cada célula inicialmente criada possui volume igual a  $1000 \mu\text{m}^3$  (BNID106738, BNID105906), energia inicial de  $9,6 \times 10^{12}$  ATPs (BNID101985), encontra-se em uma fase do ciclo celular aleatoriamente selecionada e é randomicamente definida como produtora ou não produtora de MEC.

Os comportamentos das células foram baseadas em regras mecánísticas e fenomenológicas (GLEN; KEMP; VOIT, 2019), as quais são executadas em uma sequência pré-determinada a cada unidade de tempo correspondente à regra, conforme descrito na Tabela 2. As listas de agentes foram randomizadas antes da execução de cada regra de comportamento, para prevenir o favorecimento constante de células posicionadas no início das listas de agentes por condições de maior abundância de nutrientes no microambiente da célula. Tais comportamentos são determinados pelas condições encontradas no microambiente de cada célula, definido no modelo como sua vizinhança de Moore 3D ( $r = 1$ ).

Tabela 2 - Regras de decisão das células

Sequência de execução	Regra	Classificação	Escala	Descrição
1	Nutrição	Mecanística/ Fenomenológica	$t_m$ (min)	Cada célula verifica se há glicose ou lactato e oxigênio suficiente em sua vizinhança de Moore 3D. Dependendo da proporção estequiométrica das moléculas, a via glicolítica, de fermentação ou de catabolismo de lactato é adotada para geração de energia (ATP)
2	Migração	Mecanística	$t_n$ (h)	Cada célula verifica se se encontra em meio à MEC. Caso não esteja ancorada à matriz, ela verifica se há moléculas indutoras de deslocamento (fatores de crescimento) em sua vizinhança de Moore 3D, deslocando-se para a posição da molécula identificada. Caso a condição acima não seja atendida, a célula se desloca em caminhada aleatória, caso haja espaço suficiente no poro da direção de migração (inibição por contato). Uma quantidade de energia proporcional ao comprimento do deslocamento é gasta na migração, ou caso a célula se mantenha estática, uma

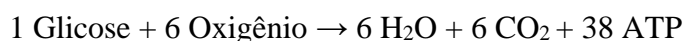
Sequência de execução	Regra	Classificação	Escala	Descrição
				quantidade de energia para manutenção da homeostases é demandada.
3	Avaliação das condições do microambiente	Fenomenológica	$t_n$ (h)	Cada célula avalia se as concentrações de glicose, oxigênio e lactato em sua vizinhança de Moore 3D estão acima do limite crítico de glicose, abaixo da concentração crítica de lactato e acima no nível crítico (apoxia) de oxigênio, respectivamente. A comparação das concentrações dessas moléculas, frente aos seus limites críticos, determinam se as condições de crescimento no microambiente são altamente favoráveis, favoráveis, medianas, medianas a severas ou severas.
	Resposta às condições do microambiente	Fenomenológica	$t_n$ (h)	Cada célula verifica a sua atual fase do ciclo celular e as condições de crescimento no microambiente. Caso o tempo de permanência na fase do ciclo celular atual tenha sido completado, a célula muda de fase do ciclo celular, podendo se dividir, produzir MEC ou enzimas que degradem a matriz extracelular (remodelagem da topologia da MEC).
4	Morte celular	Mecanística	$t_n$ (h)	Cada célula verifica se sua energia foi completamente exaurida ou se atingiu o estado de apoptose celular. Caso alguma das duas condições tenha sido atingida, a célula morre e é removida da lista de agentes.

Fonte: Willer Ferreira da Silva Junior, 2021.

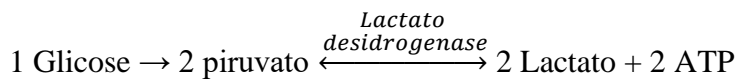
#### 4.2.1.1 Nutrição

No modelo baseado em agentes desenvolvido neste trabalho, cada célula armazena a informação da sua quantidade de energia (ATP), a qual é obtida por meio do catabolismo aeróbio ou anaeróbio de nutrientes, sendo que o rendimento energético das vias metabólicas seguem regras similares às descritas por Bayrak e colaboradores (2015) e Schurr (2017). Dessa forma, a cada unidade de tempo  $t_m$ , cada célula verifica as quantidades de glicose, oxigênio e lactato em sua vizinhança de Moore 3D, as quais determinam qual via metabólica será utilizada.

Caso a razão estequiométrica do catabolismo aeróbio de glicose seja atendida - a qual considera, implicitamente, a produção e consumo de lactato (BAYRAK *et al.*, 2015; SCHURR *et al.*, 2017; FERGUSON *et al.*, 2018; RABINOWITZ; ENERBÄCK, 2020) -, as moléculas consumidas (1 de glicose e 6 de oxigênio) são removidas das listas de agentes, rendendo à célula  $38 \times 10^{10}$  ATPs (uma vez que cada agente do tipo molécula no modelo computacional, corresponde a  $10^{10}$  moléculas no modelo experimental):

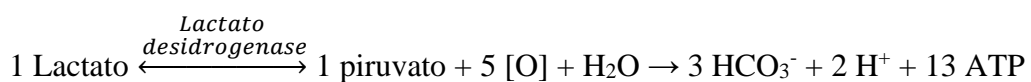


Por outro lado, caso a quantidade de oxigênio disponível no microambiente seja menor que 6, ocorre o acúmulo de lactato com sua subsequente excreção para o meio extracelular, ao passo que a glicose é anaerobicamente catabolizada – e computacionalmente removida da lista de agentes - pela célula, rendendo  $2 \times 10^{10}$  ATPs (BAYRAK *et al.*, 2015; SCHURR *et al.*, 2017; FERGUSON *et al.*, 2018; RABINOWITZ; ENERBÄCK, 2020) (uma vez que cada agente do tipo molécula no modelo computacional, corresponde a  $10^{10}$  moléculas no modelo experimental):



O acúmulo de lactato é representado no modelo pela criação de 2 moléculas/agentes de lactato na vizinhança de Moore 3D da célula (o que corresponde a  $2 \times 10^{10}$  moléculas de lactato geradas na condição experimental *in vitro*, ao longo de 1 unidade de tempo  $t_m$ ).

O lactato acumulado pode ser posteriormente convertido em energia, especialmente quando há deficiência de glicose no microambiente da célula, conforme descrito na literatura (BAYRAK *et al.*, 2015; SCHURR *et al.*, 2017; FERGUSON *et al.*, 2018; RABINOWITZ; ENERBÄCK, 2020). O catabolismo de 1 molécula de lactato requer 3 moléculas de oxigênio e rende  $13 \times 10^{10}$  ATPs à célula pela sua conversão em piruvato e seu subsequente catabolismo na matriz mitocondrial (MOOKERJEE *et al.*, 2017), conforme ilustrado na 8:

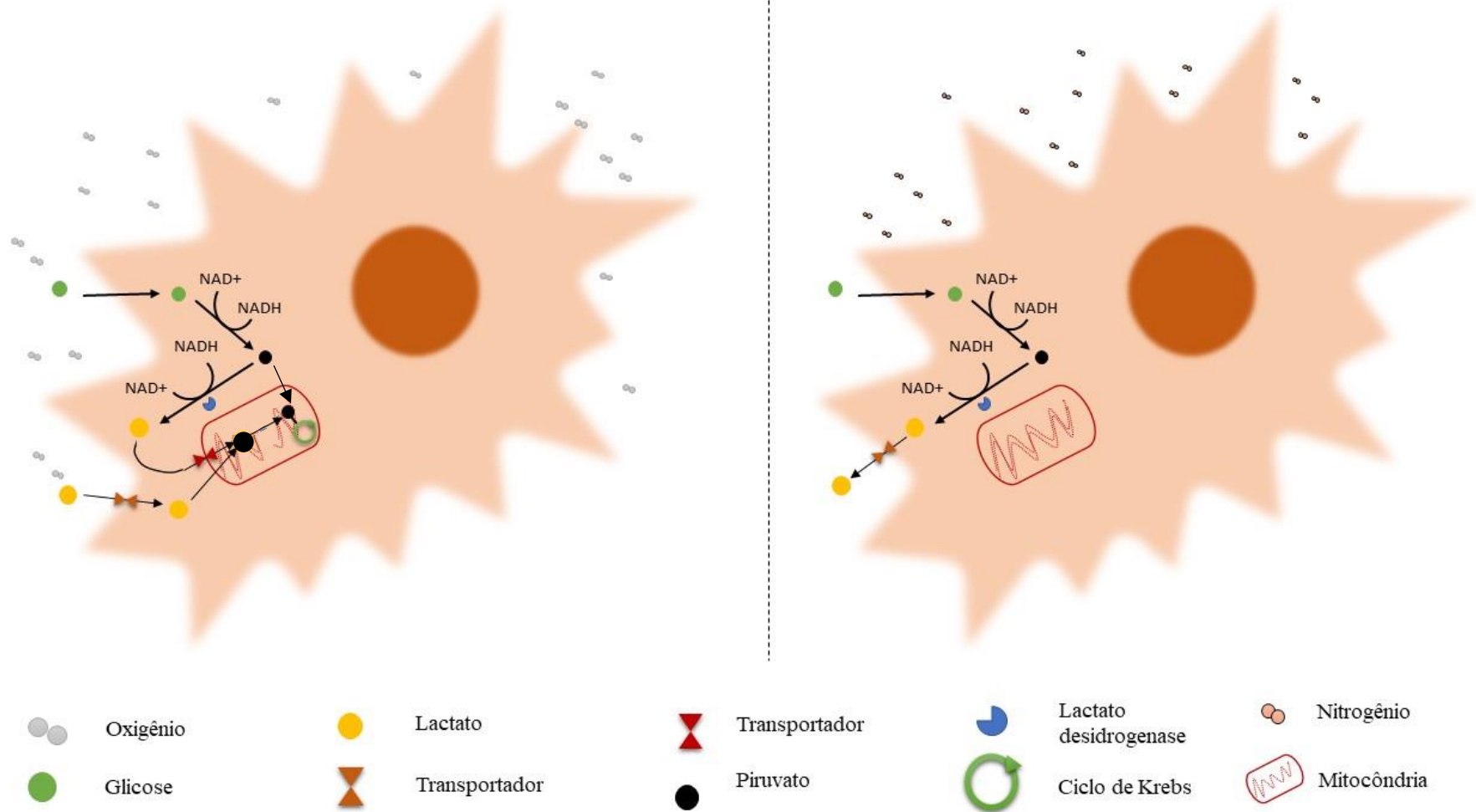


A energia adquirida durante a nutrição da célula é correlacionada ao seu tamanho/volume – por meio da equação 10, obtida por interpolação de dados experimentais - o qual, em segunda instância determina o número de células que podem ocupar o mesmo voxel, representando a inibição por contato.

$$\text{volume da célula } (\mu\text{m}^3) = \text{volume máximo} - (\text{energia máxima} - \text{energia atual}) \cdot \frac{\text{volume máximo} - \text{volume mínimo}}{\text{energia máxima} - \text{energia mínima}} \quad (10)$$

Onde os valores dos volumes mínimo e máximo, bem como de energia máxima e mínima/inicial são descritos na Tabela 7, os quais são baseados em dados da literatura referenciados na tabela.

Figura 8 – Representação do catabolismo da glicose por células eucariotas, baseado nos resultados experimentais dos últimos 30 anos.



Fonte: Adaptado por Willer Ferreira da Silva Junior, 2021, a partir da representação apresentada por Schurr, 2017. A imagem da esquerda ilustra o catabolismo de glicose e lactato na presença de oxigênio, enquanto a da direita, ilustra o acúmulo de lactato em situações de escassez de oxigênio.

#### 4.2.1.2 Migração celular

Cada célula inicialmente verifica se se encontra em processo de divisão celular e se a sua coordenada no *scaffold* é igual a 2, o qual representa que tal voxel está preenchido por componentes da matriz extracelular; caso uma dessas premissas seja verdadeira, a célula se mantém nesta posição, sendo que a manutenção da posição devido à presença de matriz extracelular no voxel representa a aderência da célula à MEC por meio de ligações de receptores integrina com moléculas da MEC (colágeno, fibronectina, por exemplo).

Na ausência de MEC em seu voxel (coordenadas  $x, y, z$  do *scaffold* correspondem a 0), a célula verifica a presença de moléculas sinalizadoras de deslocamento (representadas de forma genérica no modelo como fatores de crescimento) em sua vizinhança de Moore 3D. Ao encontrar esse tipo de molécula, a célula se desloca para a posição do fator de crescimento, mimetizando a migração por quimiotaxia. Por outro lado, se a migração por quimiotaxia não ocorre, uma posição é aleatoriamente selecionada no espaço 3D; caso a coordenada sorteada esteja localizada nos poros do *scaffold*, a célula se desloca para tal posição após avaliar a quantidade de células no voxel selecionado (inibição por contato). A inibição por contato ocorre quando o volume disponível no voxel (equação 11) é menor que o volume da célula:

$$volume\ disponível\ (\mu m^3) = d^3[x, y, z] - \sum_0^i volume\ da\ célula_i [x, y, z] \quad (11)$$

Onde  $d$  é o comprimento do voxel selecionado para a nova posição ( $[x, y, z]$ ) da célula e  $i$  representa cada célula presente no voxel selecionado.

Cada célula dispense uma quantidade de energia (denominada “walking\_energy”, no modelo) proporcional ao percurso deslocado, calculada (equação 12) conforme descrito por Flamholz, Phillips e Milo (2014), o qual é dependente do comprimento do voxel.

$$energia\ despendida\ (ATP) = int \left[ \frac{d \cdot 2 \cdot (241 \pm 100) \cdot (176 \pm 14) \cdot 10^{-3}}{5 \cdot 10^{-3}} \right] \quad (12)$$

Onde  $int$  é a função que arredonda o resultado do cálculo para um número inteiro e  $d$  é o comprimento do voxel. A cada tempo  $t_n$  as células também dispendem uma quantidade fixa de energia para a manutenção de funções básicas das células (p. ex.: manutenção da homeostase), igual a  $5,02 \cdot 10^{11}$  ATP (KILBURN; LILLY; WEBB, 1969).

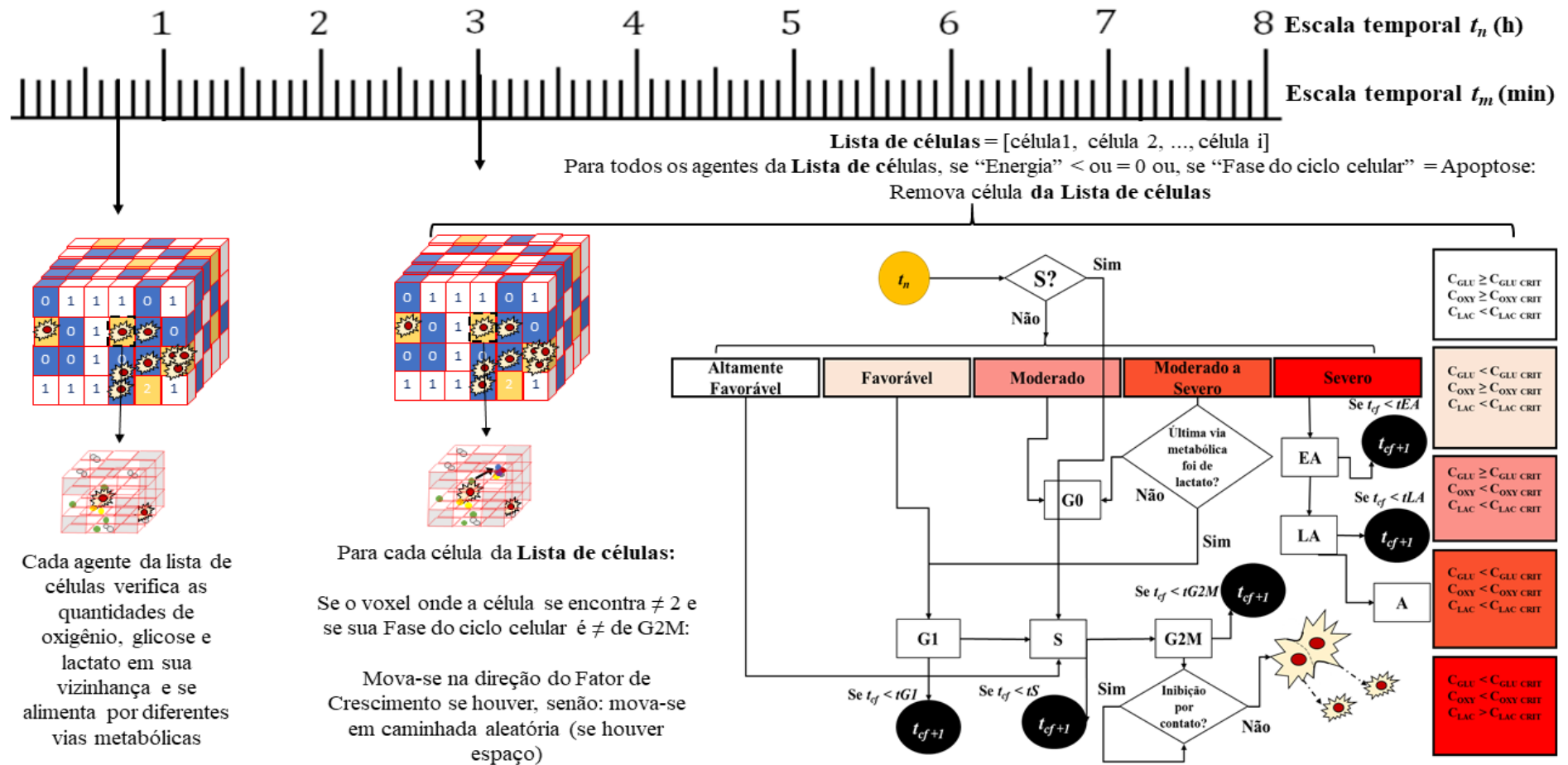
#### **4.2.1.3 Avaliação e resposta às condições do microambiente**

As células também se encontram em uma determinada fase do ciclo celular - G0, G1, S, G2M, apoptose precoce (EA), apoptose tardia (LA), apoptose (A) -, a qual é determinada pelas condições do microambiente e do metabolismo celular. As interações célula-célula e célula-MEC se dão por meio da vizinhança de Moore ( $r = 1$ , em três dimensões), de modo a representar as sinalizações parácrinas e por contato (representada pela liberação de lactato e inibição por contato, por exemplo).

Concentrações de lactato maiores que a concentração crítica de lactato induzem a célula à apoptose antecipada; no cenário de baixa concentração de lactato, baixas concentrações de oxigênio e glicose levam as células à fase G0, enquanto na situação oposta, a célula é induzida ao estado G1. Caso a energia da célula seja exaurida ou ela atinja a etapa A (apoptose), a célula morre, caso contrário ela verifica se há espaço suficiente no microambiente (inibição por contato) e se divide ao atingir a fase G2M, sendo que a energia da célula originadora é dividida igualmente com a nova célula produzida. Neste processo, a célula mãe finda a mitose na fase G1 e a célula filha, na fase G0 (BAYRAK *et al.*, 2015), sendo esta última posicionada em um dos espaços vazios da vizinhança de Moore da célula mãe. A Figura 9 resume os critérios de decisão e resposta frente às condições do microambiente.



Figura 9 - Fluxograma de decisão dos agentes do tipo célula



Fonte: Willer Ferreira da Silva Junior, 2021. O fluxograma de resposta ao microambiente foi baseado no trabalho desenvolvido por Bayrak e colaboradores (2015).  $t_{cf}$ : contador do tempo de permanência da célula na fase em questão,  $t_{EA}$ : período da fase de apoptose precoce,  $t_{LA}$ : período da fase de apoptose tardia,  $t_{G1}$ : período da fase G1,  $t_S$ : período da fase S,  $t_{G2M}$ : período da fase G2M,  $C_{glu}$ ,  $C_{oxy}$ ,  $C_{lac}$ : Frações de glicose, oxigênio e lactato na vizinhança de Moore 3D, respectivamente;  $C_{glu\ Crit}$ ,  $C_{oxy\ Crit}$ ,  $C_{lac\ Crit}$ : concentrações críticas de glicose, oxigênio e lactato, respectivamente.

#### 4.2.1.4 Morte celular

A cada unidade de tempo  $t_n$ , a quantidade de energia disponível e o estado metabólico/fase do ciclo celular de cada célula é verificado; caso a energia da célula seja menor ou igual a 0 ATP ou ainda, se a célula se encontrar em apoptose celular (A), ela é removida da lista de agentes.

### 4.3 AVALIAÇÃO DO MODELO

#### 4.3.1 Avaliação dos principais efeitos e componentes do modelo

Embora as regras de decisão do modelo, assim como valores de referência utilizados para os parâmetros fixos e dependentes de parâmetros variáveis, tenham sido baseados nas observações sobre as escalas celular e molecular por meio de intensa pesquisa na literatura e banco de dados especializados, tais valores e observações possuem amplas faixas de variação. Portanto, para compreender quais parâmetros (dados de entrada) e como eles influenciam a resposta do modelo baseado em agentes, foi realizada uma análise multivariada dos parâmetros variáveis no software estatístico Minitab® 20.3.

A Tabela 4 resume os parâmetros variáveis – também denominados fatores – abordados na análise, enquanto a Tabela 3 resume os valores variados ao longo dos experimentos *in silico* – níveis +1, 0 e -1 – os quais foram focados na simulação de cultivos em perfusão. A concentração - e conseqüentemente, o número de moléculas – de fatores de crescimento não foi avaliada como um fator, uma vez que, para se garantir a presença de ao menos uma molécula dessa categoria na simulação (baseado nas suas concentrações em cultivos *in vitro*), seria necessário aumentar consideravelmente o volume do *scaffold*, elevando o número de agentes (glicose, células, oxigênio) a quantidades que inviabilizam a execução do programa. Portanto, durante as simulações, a taxa de alimentação de moléculas de fator de crescimento adotada foi de 1 molécula/min.

Tabela 3 - Valores dos níveis adotados para cada fator

Nível	Tempo de duplicação celular	Porosidade desejada do scaffold	Diâmetro do voxel	Concentração inicial de células	Pressão parcial de oxigênio no meio	Concentração inicial de glicose	Limite de ocupação do espaço vazio
-1	21	0,6000	20	0,0000021	38	3340000	0,50
0	46,5	0,7955	30	0,0000061	89	9170000	0,75
+1	72	0,9910	40	0,0000100	140	15000000	1,00

Fonte: Willer Ferreira da Silva Junior, 2021. Os níveis -1 e +1 refletem as faixas descritas na Tabela 7, enquanto o nível 0 (ponto central) foi calculado como a média dos níveis -1 e +1.

Tabela 4 - Planejamento experimental para análise de componentes principais e seus efeitos

Simulação	Bloco	Tempo de duplicação celular	Porosidade desejada do scaffold	Diâmetro do voxel	Concentração inicial de células	Pressão parcial de oxigênio no meio	Concentração inicial de glicose	Limite de ocupação do espaço vazio
1	1	+	-	+	-	-	-	+
2	1	+	+	-	+	-	-	-
3	1	-	+	+	-	+	-	-
4	1	+	-	+	+	-	+	-
5	1	+	+	-	+	+	-	+
6	1	+	+	+	-	+	+	-
7	1	-	+	+	+	-	+	+
8	1	-	-	+	+	+	-	+
9	1	-	-	-	+	+	+	-
10	1	+	-	-	-	+	+	+
11	1	-	+	-	-	-	+	+
12	1	-	-	-	-	-	-	-
13	1	0	0	0	0	0	0	0
14	2	+	-	+	-	-	-	+
15	2	+	+	-	+	-	-	-
16	2	-	+	+	-	+	-	-
17	2	+	-	+	+	-	+	-
18	2	+	+	-	+	+	-	+
19	2	+	+	+	-	+	+	-
20	2	-	+	+	+	-	+	+
21	2	-	-	+	+	+	-	+
22	2	-	-	-	+	+	+	-
23	2	+	-	-	-	+	+	+
24	2	-	+	-	-	-	+	+
25	2	-	-	-	-	-	-	-
26	2	0	0	0	0	0	0	0
27	3	+	-	+	-	-	-	+
28	3	+	+	-	+	-	-	-
29	3	-	+	+	-	+	-	-
30	3	+	-	+	+	-	+	-
31	3	+	+	-	+	+	-	+
32	3	+	+	+	-	+	+	-
33	3	-	+	+	+	-	+	+
34	3	-	-	+	+	+	-	+
35	3	-	-	-	+	+	+	-
36	3	+	-	-	-	+	+	+
37	3	-	+	-	-	-	+	+
38	3	-	-	-	-	-	-	-
39	3	0	0	0	0	0	0	0

Fonte: Willer Ferreira da Silva Junior, 2021.

Cada condição experimental *in silico* foi realizada em triplicata (indicado na Tabela 4 como blocos) por um período de 504 unidades de  $t_n$  – correspondendo a 21 dias de cultivo - e para cada uma delas foram calculados indicadores de emergência de fenômenos espaciais e temporais (taxa de ocupação celular – equação 13 - e taxa de ocupação por MEC – equação 14 -, taxa de crescimento específico média – equação 15) (YU; BAGHERI, 2020) e de complexidade (complexidade energética média – equação 16 - e máxima – equação 17)

(CLARK; JACQUES, 2012). Posteriormente, foram avaliados os efeitos dos fatores sobre tais indicadores, determinando os principais componentes do modelo e seus efeitos.

$$Taxa\ de\ ocupação\ celular = Max \left\{ \frac{\sum_0^i volume\ célula_i}{x_{max} \cdot y_{max} \cdot z_{max} \cdot v \cdot P} \right\} \cdot \frac{t_{n-total}}{t_{Max}} \quad (13)$$

$$Taxa\ de\ ocupação\ por\ MEC = Max \left\{ \frac{\sum_0^i 1\{\forall i \in x3 / i=2\}}{x_{max} \cdot y_{max} \cdot z_{max} \cdot P} \right\} \cdot \frac{t_{n-total}}{t_{Max}} \quad (14)$$

Onde  $Max$  é a função que encontra o maior valor de uma lista,  $i$  representa cada agente ou item de uma determinada lista de dados,  $x_{max}$ ,  $y_{max}$ ,  $z_{max}$  são o comprimento, largura e altura do *scaffold* (em unidade de volxel),  $v$  é o volume do voxel cúbico,  $P$  é a porosidade do *scaffold*,  $t_{n-total}$  é o tempo total de cultivo,  $t_{Max}$  é o tempo em que ocorreu a maior ocupação do espaço vazio por célula ou MEC e  $\sum_0^i 1\{\forall i \in x3 / i = 2\}$  é a contagem de todos os elementos da lista de posições do espaço tridimensional do *scaffold* ( $x3$ ), cujo valor é igual a 2 (representação da presença de MEC).

$$\mu_{média} = \frac{\sum(\log\ Número\ de\ células - \log\ Número\ inicial\ de\ células) / (t_n - t_{inicial})}{t_n - t_{inicial} - 1} \quad (15)$$

Onde  $\mu_{média}$  é a média das taxas de crescimento específico calculadas a cada unidade de tempo  $t_n$  conforme descrito por López-Meza e colaboradores (2016). Os indicadores descritos acima, quantificam o desempenho do sistema biológico, nas condições determinadas, quanto à formação do tecido.

Por outro lado, a complexidade do sistema foi avaliada pela sistematização computacional do conceito de complexidade energética ( $C$ ) definida por Clark e Jacques (2012) como “o número de transferências de energia ativadas para um determinado sistema dentro de uma época específica e acima de um nível funcional específico”. Assim, no contexto do modelo baseado em agentes do presente trabalho, para o nível funcional celular-tecidual (dado que o objetivo do sistema modelado é a formação de tecidos), as transferências de energia dos agentes do tipo célula (elementos discretos do nível funcional) são contabilizadas a cada unidade de tempo  $t_n$  (época).

A partir da abstração do conceito de complexidade energética e da sua sistematização para o modelo baseado em agentes proposto, a seguinte avaliação das regras de comportamento celular é possível:

- Nutrição: As transferências de energia ativada se dão no nível molecular, abaixo do nível funcional;
- Migração: A energia do agente não é transferida;
- Avaliação das condições do microambiente: o agente se mantém estático, armazenando energia potencial;
- Resposta às condições do microambiente: as células transferem energia no nível funcional, ao se dividirem e ao excretarem MEC (material fundamental para a formação de tecido conjuntivo);
- Morte celular: a remoção de células do sistema reduz o potencial de complexidade energética para cada época.

Dessa forma, as complexidades energéticas média ( $\zeta_{Média}$ ) e máxima ( $\zeta_{Max}$ ) do modelo podem ser escritas como:

$$\zeta_{Média} = \frac{\sum_0^{t_{n-total}} \theta + \delta}{t_{n-total}} \quad (16)$$

$$\zeta_{Max} = \text{Max}_{0 \leq t_n \leq t_{n-total}} [\theta + \delta] \quad (17)$$

Onde  $\theta$  e  $\delta$  são o número de divisões celulares e de excreção de MEC por células ocorridas a cada unidade de tempo  $t_n$ .

Os critérios e técnicas estatísticas utilizados nesta parte do projeto são descritos em detalhe no item 4.4.

#### 4.3.2 Avaliação da reprodução do comportamento de sistemas biológicos *in vitro*

Para avaliar a capacidade do modelo em simular culturas de tecidos (cartilaginoso e ósseo, devido às similaridades existentes entre eles e o modelo) em *scaffolds*, foram analisados os resultados obtidos na simulação (em triplicata) do cultivo de células estaminais humanas derivadas de medula óssea em *scaffold* tridimensional de quitosana-óxido de grafeno, em regime de perfusão. Os resultados obtidos foram avaliados frente às regras de comportamento dos agentes estabelecidas no modelo, e comparados (qualitativamente) com as observações feitas por Lovecchio e colaboradores (2019).

A escolha do trabalho desenvolvido por Lovecchio e colaboradores (2019) foi baseada na quantidade e clareza de parâmetros utilizados nos experimentos dos autores e dos resultados

obtidos, o que é essencial para a que o presente MBA seja simulado nas condições experimentais descritas por Lovecchio e colaboradores (2019), e para que os resultados das simulações possam ser comparados com os obtidos *in vitro*, descritos no artigo de referência. Por outro lado, a simulação do *scaffold* nos experimentos *in silico* não visou reproduzir as características do *scaffold* tridimensional de quitosana-óxido de grafeno produzido pelos autores, uma vez que apenas a porosidade e tamanho de voxel foram avaliados como variáveis nas simulações.

O modelo foi simulado em condições de cultivo similares às descritas pelos autores, com exceção aos estímulos mecânicos e químicos para diferenciação das células em fenótipos osteogênicos, presentes no estudo *in vitro*, os quais não fazem parte do modelo desenvolvido no presente trabalho. A Tabela 5 resume os valores adotados para os parâmetros variáveis durante a simulação das condições experimentais do estudo do desempenho do biorreator autônomo desenvolvido por Lovecchio e colaboradores (2019).

Tabela 5 - Valores das variáveis utilizados na avaliação do modelo

Variável do modelo	Valor adotado	Unidade	Observação
Tempo de cultivo	14	Dias	N/A
Largura do scaffold	9	Voxels (180 $\mu\text{m}$ )	N/A
Comprimento do scaffold	9	Voxels (180 $\mu\text{m}$ )	N/A
Altura do scaffold	9	Voxels (180 $\mu\text{m}$ )	N/A
Porosidade desejada do scaffold	0,764	N/A	Uma vez que a porosidade do <i>scaffold</i> fabricado por Lovecchio e colaboradores (2019) não foi descrita no artigo, adotou-se a porosidade média caracterizada para <i>scaffold</i> de quitosana-óxido de grafeno fabricados pelo mesmo método, descrito por Dinescu e colaboradores (2019).
Diâmetro do voxel	20	$\mu\text{m}$	Tamanho proposto baseado nos resultados obtidos na caracterização do <i>scaffold</i> no presente trabalho.
Concentração inicial de células	$1 \times 10^6$	célula/mL	N/A
Estágio do ciclo celular do inóculo	Aleatoriamente selecionado entre G <sub>0</sub> , G <sub>2</sub> M, G <sub>1</sub> e S	N/A	Definição baseada na descrição de que as células foram expandidas e transferidas para o <i>scaffold</i> . Portanto, é esperado que o inóculo esteja em sua fase exponencial de crescimento
Pressão parcial de oxigênio no gás injetado na cultura	152	mmHg	20% de CO <sub>2</sub>

Variável do modelo	Valor adotado	Unidade	Observação
Concentração inicial de glicose	0,1	g/L	Os autores (LOVECCHIO <i>et al.</i> , 2019) utilizaram meio DMEM para o cultivo em perfusão, com concentração de glicose de 1 g/L. Entretanto, esse valor foi reduzido para 0,1 g/L na simulação do modelo, pois nos experimentos <i>in vitro</i> , o meio de cultura foi renovado a cada 3 dias (o meio de cultura foi recirculado, e não necessariamente renovado, ao longo de toda a perfusão).
Taxa de alimentação de glicose	744	molécula/ min	Foi considerada a taxa de perfusão (1 mL/min) por unidade de volume do reator (300 µL) descrito pelos autores. Esse valor (tempo de residência) foi multiplicado pela concentração de glicose em meio mínimo considerada para a simulação (0,1 g/L) e volume do <i>scaffold</i> (do presente trabalho).
Taxa de alimentação de oxigênio	264	molécula/ min	Foi considerada a taxa de perfusão (1 mL/min) por unidade de volume do reator (300 µL) descrito pelos autores. Esse valor (tempo de residência) foi multiplicado pela concentração de oxigênio dissolvida no meio de cultura – calculado pela pressão parcial de O <sub>2</sub> e a Lei de Henry - e volume do <i>scaffold</i> (do presente trabalho).
Tipo de cultivo	p = cultivo em modo perfusão	N/A	N/A
Concentração de fatores de crescimento	1,15x10 <sup>-10</sup>	g/mL	Os autores (LOVECCHIO <i>et al.</i> , 2019) utilizaram lisado de plaquetas humanas a 10%, como substituto de soro fetal bovino. Por se tratar de uma mistura complexa e não padronizada, a concentração de fatores de crescimento nessa solução é variável. Na simulação, foi utilizada a soma das médias das concentrações de fatores de crescimento em lisado de plaquetas humanas, descritas por Shanskii e colaboradores (2013), multiplicado por 100.
Limite de ocupação do espaço vazio por MEC	0,8	N/A	N/A

Fonte: Willer Ferreira da Silva Junior, 2021.

Os parâmetros fixos, aleatoriamente definidos, ou dependentes diretamente dos parâmetros variáveis definidos na Tabela 5, foram mantidos conforme detalhado na Tabela 7, assim como os valores dos parâmetros variáveis dos experimentos *in vitro* conduzidos por Lovecchio e colaboradores (2019), foram apropriadamente convertidos para as unidades de medida adotadas no modelo (Tabela 7).

A concentração de fatores de crescimento adotada na simulação também diferiu da utilizada nos experimentos *in vitro*, uma vez que ela é indiretamente descrita nos protocolos de

cultivo de células pela concentração em porcentagem (v/v) de soro fetal bovino ou lisado plaquetário adicionado ao meio de cultura. Para possibilitar a estimativa desse parâmetro, as concentrações médias dos fatores de crescimento PDGF, IGF-1, TGF- $\beta$  e VEGF reportados por Shanskii e colaboradores (2013) foram convertidas para a unidade de moléculas/ $\mu\text{m}^3$  e somadas, fazendo uso dos pesos moleculares de tais moléculas (CID 11554659, CID 5748425, CID 56842206 e CID 16192751, respectivamente). Além disso, tal concentração foi adotada como 100 vezes maior que a descrita nos experimentos *in vitro* de Lovecchio e colaboradores (2019), para garantir a introdução (*in silico*) de ao menos 1 molécula de fator de crescimento por unidade de tempo  $t_m$  no *scaffold* de  $5.832.000 \mu\text{m}^3$  (volume útil de  $4.455.648 \mu\text{m}^3$ ).

Devido às diferenças de estrutura de *scaffold*, diferenciação celular, tempo de ciclo celular e fatores de crescimento entre os modelos *in vitro* (LOVECCHIO *et al.*, 2019) e *in silico* (presente trabalho), os resultados de ambos os modelos foram comparados qualitativamente, observando os perfis de consumo de nutrientes, crescimento celular e produção de matriz extracelular.

As mesmas condições descritas para a simulação do cultivo em perfusão foram utilizadas na simulação de cultivo em batelada (com exceção da concentração de glicose, para a qual foi adotada a quantidade geralmente utilizada em meios de cultura – 1g/L) com (porosidade de 0,764) e sem *scaffold*.

#### 4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICAS

O intervalo de estabilidade de cada parâmetro de caracterização do *scaffold* avaliado foi calculado pela técnica de *bootstrapping*, conforme descrito por Leydesdorff, Bornmann e Mingers (2019): a partir do conjunto de dados (população) gerado pelo algoritmo de produção do *scaffold* ( $x_{max}=12$ ,  $y_{max}=12$ ,  $z_{max}=1000$ ), 100 amostragens ( $B$ ) de tamanho  $N$  ( $x_b=12$ ,  $y_b=12$ ,  $z_b=100$ ) foram realizadas; a cada amostragem, o parâmetro a ser analisado (porosidade, tamanho de poro, permeabilidade, módulo de elasticidade) foi calculado e armazenado, gerando uma distribuição de valores do estimador.

Após a lista de valores do estimador em questão ser ordenada em ordem crescente, o intervalo de estabilidade para os dados do estimador foi definido como o 2,5° (limite inferior) e 97,5° (limite superior) termo da sua distribuição de dados (de 100 amostragens). Os grupos de dados são considerados estatisticamente diferentes caso os intervalos de estabilidade desses grupos não se sobreponham.

Análise multivariada de dados derivados de um planejamento experimental (Plackett-



Burman Design) para triagem e identificação dos principais componentes que afetam os indicadores de desempenho do cultivo de tecido (*in silico*) foi realizado com o auxílio do software estatístico Minitab® 20.3 (64-bit). Para tal, os valores mínimo e máximo dos parâmetros variáveis descritos na Tabela 7 foram adotados como níveis inferior e superior, respectivamente, e o valor médio como o ponto central.

Os indicadores de desempenho, emergência e complexidade descritos no item 4.3.1 obtidos em cada condição experimental (*in silico*) foram tabulados e o efeito de cada parâmetro variáveis para tais indicadores foram determinados por gráficos de efeitos principais, bem como pelo resultado de *p-valor* calculado para as interações de primeira e segunda ordem dos fatores (ANOVA para regressão multivariada). A normalidade dos resíduos padronizados do modelo de regressão multivariada foi avaliada, sendo que para todo teste de hipótese, adotou-se o nível de significância de 5% e/ou intervalo de confiança de 95%.

Por fim, as variáveis de saída/resposta obtidas nas simulações de cultivos celulares foram reportadas graficamente pela médias de tais respostas (linhas sólidas dos gráficos) e seus respectivos intervalos de confiança (95% de confiança), calculados automaticamente pela função “seaborn.lineplot” utilizando a técnica de *bootstrapping* (número de amostragens = 1000).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

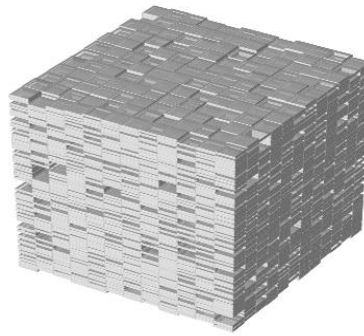
### 5.1 CARACTERIZAÇÃO DO SCAFFOLD

A principal pergunta a ser respondida nesta secção do projeto foi se diferentes níveis de porosidade, diâmetro de célula unitária e materiais de fabricação do *scaffold* resultam em parâmetros topológicos, fluidodinâmicos e mecânicos significativamente diferentes. A resposta para essa questão possui importância não só para os experimentos *in vitro* em engenharia de tecidos, mas também para a avaliação do modelo de produção do *scaffold in silico* desenvolvido neste trabalho, uma vez que o algoritmo lança mão de variáveis e decisões aleatórias para a fabricação do arcabouço.

A Figura 10 apresenta o *scaffold* produzido pelo modelo, sendo que a decisão pela dimensão de  $z_{max}=1000$  foi com o intuito de aumentar a probabilidade de aparição de situações anômalas e assimétricas na estrutura 3D, promovida pela geração aleatória do *scaffold*. Por outro lado, a Figura 11 mostra cortes transversais de *scaffolds* produzidos com as mesmas dimensões utilizadas nas análises de intervalo de estabilidade, com porosidade teórica variando de 10 a 90%, indicando a formação de poros interconectados de tamanho crescente, à medida que se aumenta a porosidade.

Tais resultados se assemelham (visualmente) ao modelo computacional de arcabouços cúbicos gerados pelo modelo de reação-difusão utilizado por Velasco, Lancheros e Garzón-Alvarado (2016), divergindo nas características aleatórias e de clusterização dos espaços preenchidos dos *scaffold* nos dois modelos computacionais. Por outro lado, modelos matemáticos como o de reação-difusão, de superfície mínima periódica ou de estruturas fractais (KUMAR; PANDITHEVAN, 2009; DINIS *et al.*, 2014; KAPFER *et al.*, 2011) podem ser facilmente implementadas no algoritmo desenvolvido para produzir padrões de poros interconectados na estrutura tridimensional, aproximando-a de estruturas observadas em sistemas biológicos.

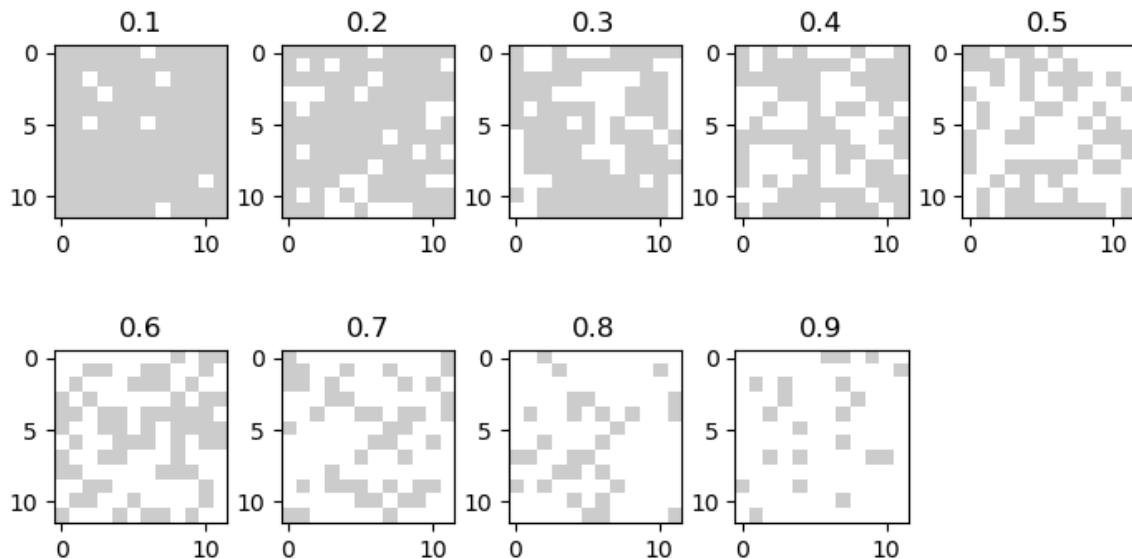
Figura 10 - Scaffold produzido pelo algoritmo desenvolvido, com dimensões  $x_{max} = 12$ ,  $y_{max} = 12$ ,  $z_{max} = 1000$ .



Fonte: Willer Ferreira da Silva Junior, 2020. A estrutura acima possui porosidade teórica de 90%, sendo os espaços vazios/transparentes, uma representação dos poros de um *scaffold* real.

No trabalho desenvolvido por Velasco, Lancheros e Garzón-Alvarado (2016), uma condição homogênea de Neumann foi adotada para simplificar a solução das equações diferenciais por meio do método Newton–Raphson no FORTRAN, permitindo uma perturbação de  $\pm 10\%$  nos valores dos termos reativos do modelo. A cada solução das equações de reação-difusão pelo método dos elementos finitos em cada nó, caso a concentração do polímero fosse maior que a concentração de referência (determinada quando uma porosidade de 50% do *scaffold* foi obtida), o elemento era considerado como sólido.

Figura 11 – Cortes transversais dos *scaffolds* a diferentes níveis de porosidade



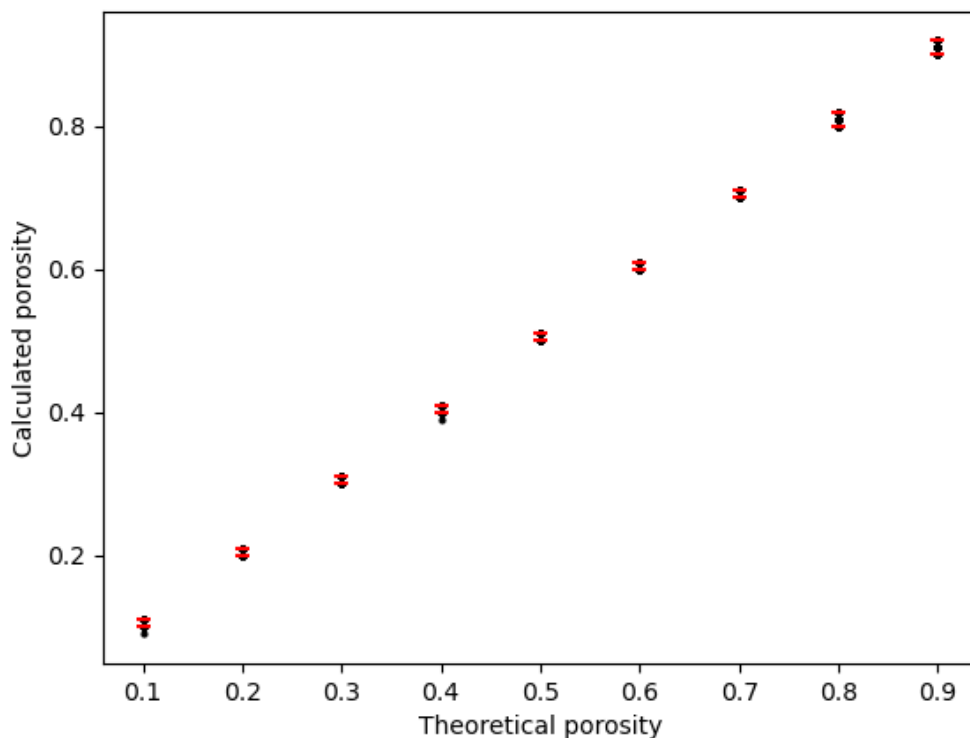
Fonte: Willer Ferreira da Silva Junior, 2021. Os cortes apresentados acima foram realizados na altura  $z = 500$  do *scaffold* produzido com dimensões  $x_{max}=12$ ,  $y_{max}=12$ ,  $z_{max}=1000$  e porosidades variando de 10 a 90% (a porosidade é indicada acima de cada plano 2D), sendo os espaços vazios/transparentes, uma representação dos poros de um *scaffold* real. As células unitárias de valor igual a 1 são representadas em cinza.

A Figura 12 mostra que, embora o algoritmo preencha aleatoriamente o espaço

tridimensional com valores 1 (o qual representa a ocupação do espaço pelo material de fabricação do *scaffold*), a porosidade real obtida para cada 10% de variação de porosidade teórica (cujo valor deve ser determinado pelo usuário do programa, representando a porosidade desejada/esperada pelo programador) é significativamente diferente, independentemente do posicionamento dos poros no *scaffold*.

A figura também mostra que a construção do *scaffold* é acurada (a correspondência da porosidade teórica com a calculada é uma reta de inclinação igual a 1) e precisa (baixa variabilidade dos dados, o que pode ser visto pelos intervalos de estabilidade estreitos) ao longo da faixa de 10 a 90% da porosidade. Tal correspondência entre porosidade teórica e calculada pode ser facilmente verificada por meio dos cortes apresentados na Figura 11, onde são observadas aumentos graduais de espaços vazios (quadrados brancos/transparentes) ao longo dos cortes de porosidade crescente.

Figura 12 - Intervalo de estabilidade da porosidade calculada/medida *versus* porosidade teórica



Fonte: Willer Ferreira da Silva Junior, 2021. Os pontos pretos representam os valores de porosidade calculados em cada amostragem para cada porosidade teórica, enquanto os traços vermelhos representam os limites superior (97,5° percentil) e inferior (2,5° percentil) do intervalo de estabilidade, considerando 95% de confiança.

A adoção desse modo de modelagem de estruturas tridimensionais que mimetizam *scaffolds*, embora um tanto distante das estruturas tridimensionais biológicas (geralmente encontradas na forma de fibras - geometria cilíndrica), possibilita o estudo e desenvolvimento

inicial do modelo baseado em agentes para simulação da cultura de células 3D. Este modelo também é adequado para estudos *in silico* de cultura de tecidos em *scaffold* macroporosos que servem de base para a adesão de células fixas que secretarão MEC e moléculas sinalizadoras para a formação de tecidos.

Além disso, tal modo de representação dos espaços vazios e ocupados da estrutura (cuja coordenada possui valor binário) possibilita fácil adaptação para a simulação computacional de estruturas reais a partir de imagens de *scaffold* sintéticos ou naturais de fibrina e colágeno, obtidas por microscopia eletrônica de varredura, por exemplo, – em formato .tif ou .tiff, por meio de módulos de pacotes de análise e processamento de imagens do Python, tais como Sci-kit Image (Skimage), Python Imaging Library (PIL or Pillow) ou Open CV (SCIKIT-IMAGE, 2020; PILLOW, 2020; OPEN CV, 2020). Isso, porque os pixels da imagem são representados como uma matriz de valores numéricos nas coordenadas (x,y), em que cada valor atribuído à coordenada corresponde a uma cor (VAN DER WALT *et al.*, 2014). A partir do modelo computacional do *scaffold*, o arcabouço pode ser posteriormente fabricado por impressão 3D para uso em cultura de células.

Em uma abordagem simples, o uso de técnicas de filtro, suavização e *threshold* de um conjunto de cortes seccionais ao longo do eixo z do *scaffold* real é suficiente para reconstruir a estrutura em Python, possibilitando também, cálculos acurados da porosidade do *scaffold* e espessura das estruturas fibrilares (fibrina, colágeno), como descrito por Fischer, Hayn e Mierke (2020). No trabalho desenvolvido pelos autores, eles utilizaram imagens capturadas a cada 25  $\mu\text{m}$  de comprimento, de modo a reconstruir a matriz tridimensional e possibilitar o cálculo da espessura das fibrilas e tamanho dos poros do *scaffold*.

Nunez-Iglesias e seus co-autores (2018) utilizaram técnicas de suavização, *thresholding thinning* de imagens de microscopia eletrônica (por meio dos pacotes SciPy e Pandas) de células sanguíneas para demonstrar como o citoesqueleto das células é alterado pelo parasita *Plasmodium falciparum*, causador da malária. Fischer, Hayn e Mierke (2019) desenvolveram e validaram um método de análise avançada de tamanho dos poros em duas etapas utilizando ferramentas de processamento de imagens e diferentes tipos de colágenos artificiais - mistura de colágeno de ratos e colágeno bovino com duas concentrações diferentes.

Os autores aplicaram uma técnica de remoção de ruídos de variação total e em seguida, a técnica de segmentação pelo pico da gaussiana de distribuição de intensidade dos pixels de cada camada ( $\Delta z$ ) da altura do *scaffold*, de modo que, a presença de fibra de colágeno corresponde a um pixel cujo valor é 1, e a ausência de fibra corresponde a 0. Por fim, a suavização dos dados do mapa de distância euclidiana aplicada aos espaços não fibrilares,

resultaram em valores de diâmetros dos poros, sendo que o poro do *scaffold* foi calculado como a mediana dos poros encontrados (FISCHER; HAYN; MIERKE, 2019).

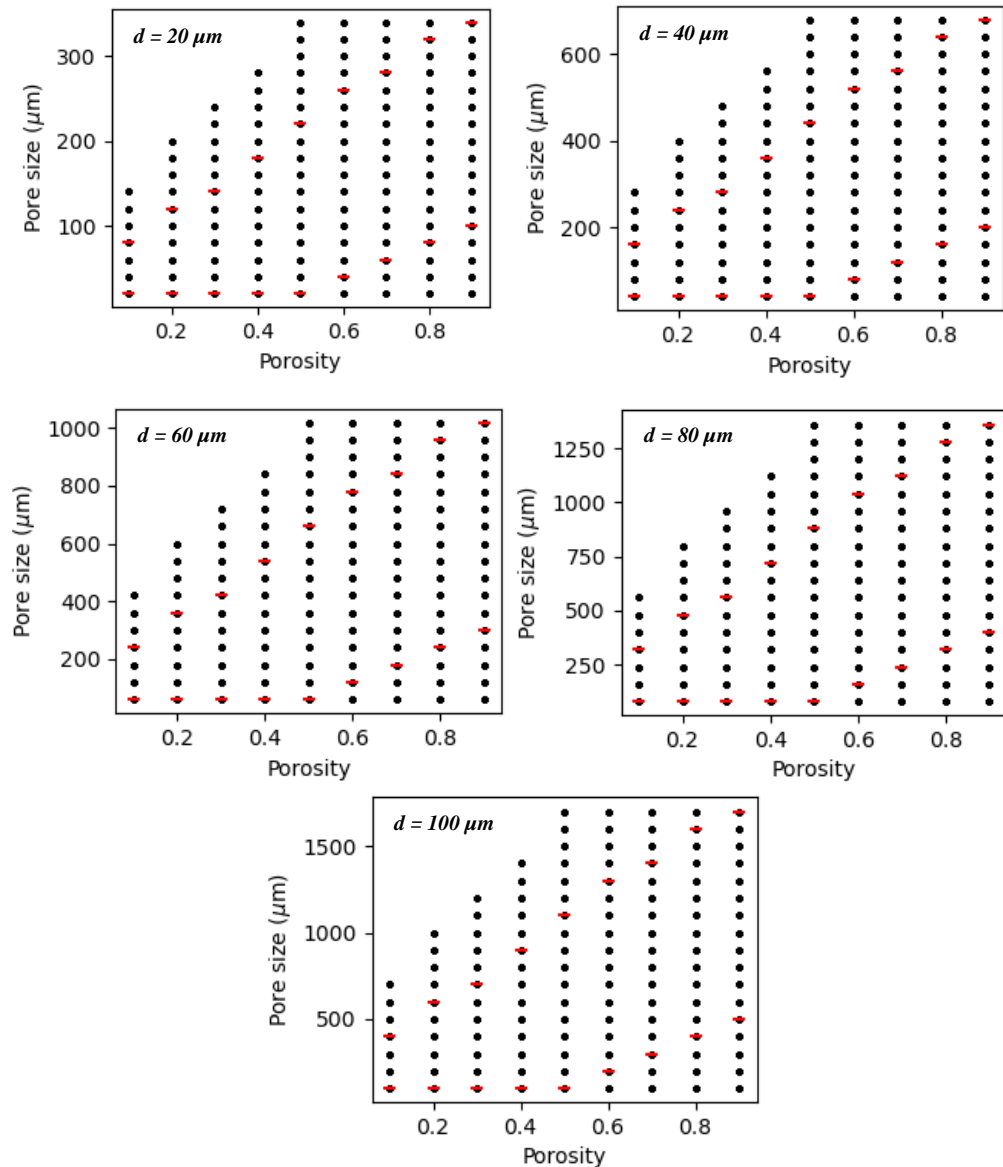
Partindo da técnica de segmentação, mas utilizando *machine learning* global e local, Hotaling, Bharti, Kriel e Simon (2015) desenvolveram o programa DiameterJ, uma ferramenta de plataforma aberta para medição do tamanho de fibras por meio de imagens de microscopia eletrônica de varredura, tendo como diferencial, o cálculo de outros parâmetros, tais como tamanho característico e densidade de intersecção das fibras.

Tais pesquisas, além de mostrar os benefícios da aplicação do processamento de imagens no campo da biologia celular, reitera o benefício do uso do algoritmo de geração de *scaffold* tridimensional descrito neste trabalho para o desenvolvimento do modelo baseado em agentes.

A Figura 13, por outro lado, mostra que não há diferença estatística no tamanho dos poros ao longo do *scaffold* na faixa de 10 a 80%, para cada tamanho de  $d$  analisado, uma vez que os intervalos de estabilidade dos tamanhos dos poros se sobrepõem nesta faixa de porosidade (apenas o tamanho de poros a 90% de porosidade é estatisticamente diferente do obtido a 10% de porosidade). A Figura 13 também evidencia o aumento da variabilidade do tamanho dos poros – sendo possível encontrar poros do menor ao maior tamanho possível, para cada valor de  $d$  – à medida que se aumenta a porosidade do *scaffold*. Por outro lado, o algoritmo é capaz de produzir poros interconectados com crescente tamanho médio de poros (perceptível pela elevação do intervalo de estabilidade a cada  $P$ ), assim como é observado nas análises estruturais de arcabouços sintéticos, naturais ou obtidos por simulação, descritos na literatura (EGAN; SHEA; FERGUSON, 2018; EGAN *et al.*, 2017; NYBERG; O’SULLIVAN; GRAYSON, 2019).

Uma grande variabilidade (como consequência, uma grande amplitude) do tamanho dos poros também foi observada por Nyberg, O’Sullivan e Grayson (2019), bem como por Guarino, Causa e Ambrosio (2007), durante a caracterização de *scaffolds* sintéticos de poli-caprolactona polimerizada em solução 20% (m/m) de N-N-dimetil-acetamida com partículas de NaCl de tamanhos 150 - 212, 212 - 300 e 300 - 500  $\mu\text{m}$ . Em tal estudo, após ocorrida a reação de polimerização, os solventes foram extraídos com etanol e os cristais de NaCl, dissolvidos pela lavagem do *scaffold* com água, resultando em estruturas com porosidades de 45,7 a 83,9% para as diferentes faixas de tamanho de poros.

Figura 13 - Intervalo de estabilidade do tamanho dos poros por porosidade teórica, para diferentes valores de  $d$ .



Fonte: Willer Ferreira da Silva Junior, 2021. Os pontos pretos representam os valores de tamanho de poro calculados em cada amostragem para cada porosidade teórica, enquanto os traços vermelhos representam os limites superior (97,5° percentil) e inferior (2,5° percentil) do intervalo de estabilidade, considerando 95% de confiança. O aumento de  $d$  eleva a magnitude do tamanho dos poros do *scaffold* para cada fração de espaço vazio estudada. Os tamanhos de poros em diferentes porosidades são considerados estatisticamente diferentes quando os intervalos de estabilidade não se sobrepõem.

Kim e colaboradores (2019) também observaram um aumento na média e amplitude do tamanho dos poros de *scaffolds* ósseos artificiais de hidroxiapatita porosa (HA) com a elevação da sua porosidade - obtida por meio da adição de diferentes concentrações de poli (metacrilato de metila) (PMMA) -, variando de, aproximadamente, 50 a 400  $\mu\text{m}$ . Antes do processo de sinterização, o poro médio do *scaffold* foi de 89,34  $\mu\text{m}$ , e a maioria dos poros encontravam-se distribuídos na faixa de 65 - 108  $\mu\text{m}$ .

Dados da literatura sobre *scaffolds* sintéticos e híbridos desenvolvidos e aplicados à

regeneração de tecidos cartilagosos mostram uma ampla faixa de tamanho de poros, mesmo quando a porosidade é superior à 70%, a depender do material e técnicas de fabricação de *scaffold* utilizados (p. ex.: *scaffold* de PLCL, com porosidade aproximada de 85%, apresentou tamanho de poro de 200–500  $\mu\text{m}$ ; *scaffold* de PLCL-COLI, fabricado por impressão 3D, apresentou porosidade de aproximadamente 85% e tamanho de poro de 10  $\mu\text{m}$  a 450  $\mu\text{m}$ ). Segundo Wasyleczko, Sikorska e Chwojnowski (2020), poros de tamanho de 150 – 250  $\mu\text{m}$  são desejáveis para células autólogas, enquanto poros maiores (aproximadamente 300  $\mu\text{m}$ ) são mais adequados para células tronco mesenquimais na regeneração de tecidos cartilagosos (WASYŁECZKO; SIKORSKA; CHWOJNOWSKI, 2020).

O tamanho dos poros do *scaffold* afeta não só as propriedades mecânicas e fluidodinâmicas do material, mas também as propriedades funcionais do *scaffold* no desenvolvimento do tecido. Neste contexto, o tamanho de poro e porosidade ideais dependem do tipo de tecido a ser produzido e ainda assim, para um mesmo tipo de tecido, não há um consenso sobre valores ótimos para tais parâmetros do arcabouço entre a comunidade científica. Alguns autores sugerem que os *scaffolds* devem possuir porosidade entre 50 e 80% (para aplicações em produção de tecidos ósseos) e tamanho de poro mínimo de 50  $\mu\text{m}$  para promover a vascularização do tecido e menor que 1000  $\mu\text{m}$ , uma vez que poros muito grandes diminuem o crescimento celular dependente de curvatura (EGAN *et al.*, 2017; EGAN; SHEA; FERGUSON, 2018). Chantre e colaboradores (2019) reportam a rápida formação de tecido de granulação, neovascularização, reepitelização e cicatrização em camundongos C57BL com lesões na pele, após 6 dias de implantação de *scaffold* de fibras de ácido hialurônico de alta porosidade (85 – 95%), enquanto Turnbull e co-autores (2018) descrevem que poros de tamanho próximo a 300  $\mu\text{m}$  estimulam a osteogênese em tecidos ósseos e poros de tamanho próximo a 100  $\mu\text{m}$  estimulam a condrogênese em tecidos cartilagosos.

Guarino, Causa e Ambrosio (2007), sugerem que uma porosidade de 90% e poros de até 100  $\mu\text{m}$  favorecem a penetração de células no *scaffold* e a vascularização adequada do tecido. Liu e co-autores (2020a, 2020b) e Chanes-Cuevas e colaboradores (2018) por outro lado, demonstram e explicam a importância da presença e hierarquização de meso (<100 nm), micro (<10  $\mu\text{m}$ ) e macroporos (> 100  $\mu\text{m}$ ) em *scaffolds*, para a vascularização, mineralização, regeneração e osteoimunomodulação na formação de tecidos ósseos.

Os autores investigaram os efeitos do *scaffold* de poli(3-hidroxi butirato-co-3-hidroxi hexanoato) (PHBHHx) com macro-micro-meso poros em características de células endoteliais da veia umbilical humana (HUVECs) – tais como de adesão celular expressão de genes de marcadores endoteliais. Este *scaffold* apresentou poros interconectados com poros de



diâmetro máximo igual a  $352 \pm 58 \mu\text{m}$  e porosidade  $85.95 \pm 0.0$  e proporcionou condições nas quais as células consumiram glicose e produziram lactato mais rapidamente, além de expressarem mais genes de marcadores endoteliais, quando comparado com outros *scaffolds* contendo apenas macro, ou macro-meso poros (LIU *et al.*, 2020b).

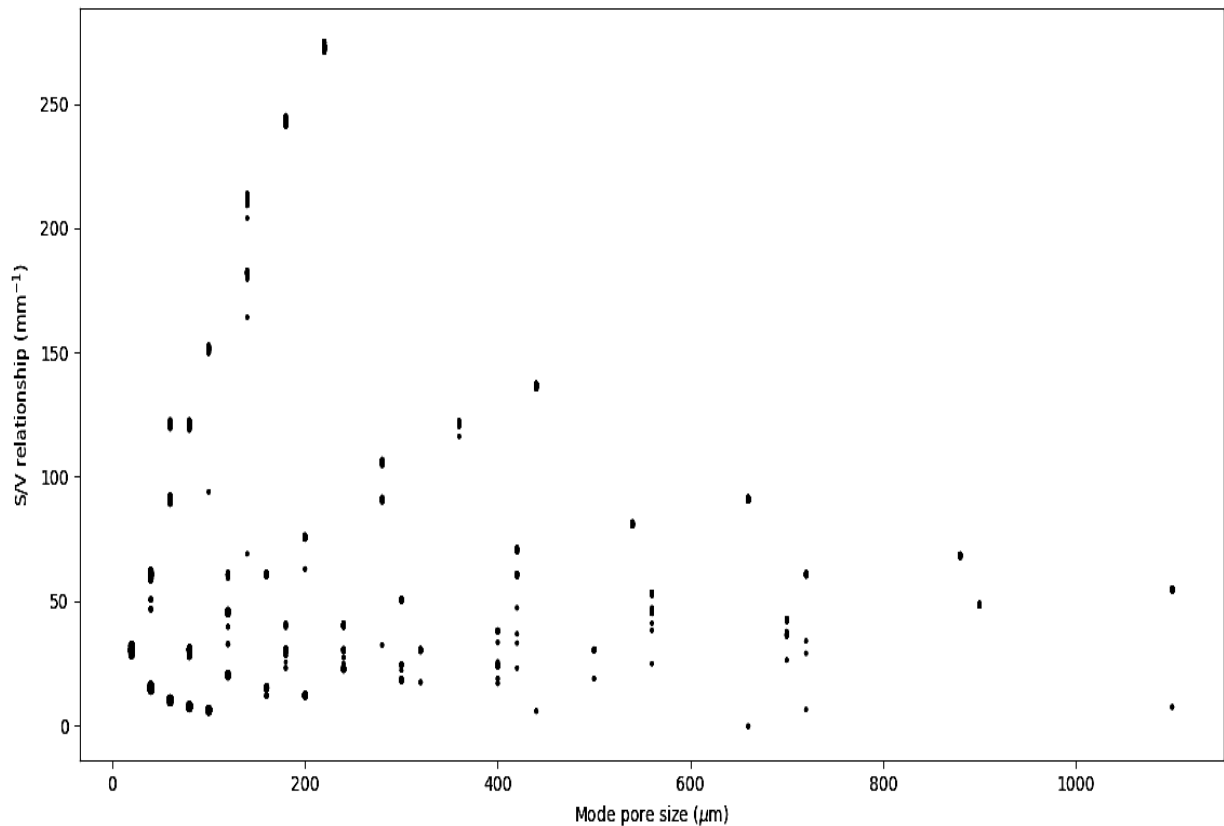
As imagens da análise angiográfica por microtomografia computadorizada mostraram uma formação de vasos em tecidos lesionados (após a aplicação do *scaffold*) 1,51 vezes superior a obtida com *scaffolds* contendo macro e macro-mesoporos após 8 dias do implante, e após 12 dias, o tecido ósseo inicialmente fraturado contendo o *scaffold* encontrava-se praticamente regenerado, exibindo ósteons e osso lamelar. A partir dos resultados encontrados, os autores propuseram que os macroporos promovem a adesão, crescimento e infiltração de células, os microporos melhoram o metabolismo e sinalização celular, e os mesoporos estimulam a proliferação e diferenciação celular (LIU *et al.*, 2020b).

Egan e colaboradores (2017), por outro lado, afirmaram que poros de  $200 \mu\text{m}$  são desejáveis em *scaffolds* desenvolvidos para implantes de gaiolas intervertebrais, uma vez que promovem a adesão celular às paredes do material pelo aumento da relação área de superfície-volume e permitem que as células preencham as cavidades mais rapidamente, embora poros maiores ( $800 \mu\text{m}$ ) devam estar presentes para a vascularização e transporte de nutrientes.

De fato, conforme observado na Figura 14, os maiores valores da relação área de superfície dividida pelo volume nominal do *scaffold* são encontrados entre poros de tamanho entre  $150 - 250 \mu\text{m}$ , aproximadamente. Na Figura 14 o tamanho e intensidade dos pontos indicam a frequência com que cada tamanho de poro aparece ao longo das simulações de *bootstrapping*, para *scaffolds* de porosidade de  $10 - 90\%$  e tamanho de célula unitária de  $20 - 100 \mu\text{m}$ . Portanto, a partir da Figura 13 e da Figura 14, é possível concluir que valores de  $d$  de  $20$  a  $40 \mu\text{m}$  são suficientes para produzir *scaffolds* constituídos de macro e microporos, por meio do algoritmo de modelagem de *scaffold* 3D de células unitárias cúbicas descrito neste trabalho.

No modelo baseado em agentes descrito neste trabalho, as regras de decisão e interação agente-ambiente ocorrem nos espaços de macro e micro poros, e fenômenos de diferenciação celular não são abordados neste modelo. Por outro lado, uma vez que a diferenciação e proliferação celular são induzidas principalmente por moléculas sinalizadoras, regras de decisão para tais fenômenos podem ser adicionadas ao modelo, introduzindo novas moléculas (p. ex., fator de crescimento de tecido conjuntivo) como agentes, com regras similares às adotadas para as moléculas glicose, lactato e oxigênio.

Figura 14 - Variação da razão S/V em função do tamanho dos poros



Fonte: Willer Ferreira da Silva Junior, 2021. O tamanho e intensidade dos pontos do gráfico são proporcionais à frequência com que a moda do tamanho dos poros aparece ao longo das simulações, indicando a probabilidade de ocorrência de tal tamanho de poro em *scaffolds* com diferentes tamanhos de  $d$ .

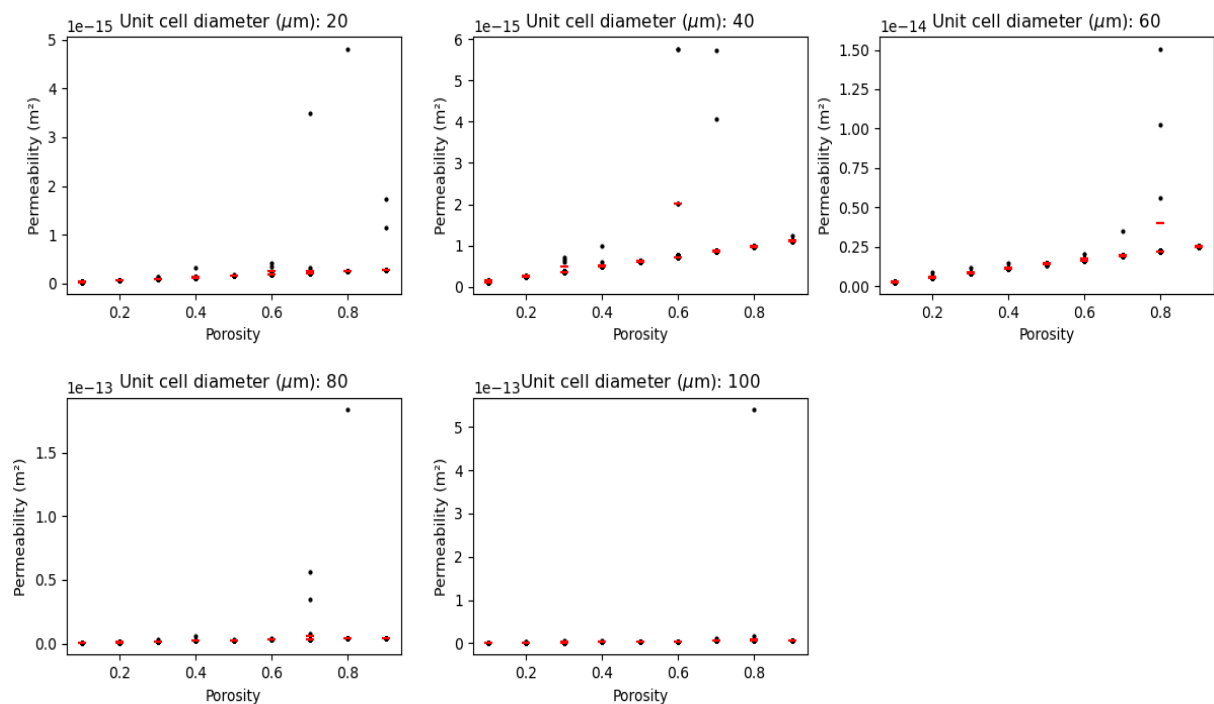
A Figura 15 mostra como a magnitude da permeabilidade alterada pela mudança de porosidade do *scaffold* em diferentes tamanhos de poros. Tal parâmetro, fundamental para garantir que a transferência de massa seja adequada para a nutrição e crescimento celular, apresenta intervalos de estabilidade estreitos de, aproximadamente,  $0,1$  a  $0,3 \times 10^{-15} \text{ m}^2$  para  $d = 20 \text{ } \mu\text{m}$ ,  $0,1$  a  $2 \times 10^{-15} \text{ m}^2$  para  $d = 40 \text{ } \mu\text{m}$ ,  $0,1$  a  $0,35 \times 10^{-14} \text{ m}^2$  para  $d = 60 \text{ } \mu\text{m}$ ,  $0,1 \times 10^{-13} \text{ m}^2$  para  $d = 80$  e  $100 \text{ } \mu\text{m}$ , os quais estão de acordo com os valores de permeabilidade propostos por Koh e colaboradores (2019) como ótimos para *scaffold* utilizados na regeneração de tecido cartilaginoso ( $0,5$ ,  $1$  e  $2 \times 10^{-14} \text{ m}^2$  para as zonas superior, intermediária e inferior da cartilagem, respectivamente).

Tal constatação pode ser explicada pela equação 5. Enquanto  $K$  é uma constante, a porosidade altera a permeabilidade em uma ordem de  $10^{-3}$  a  $7 \times 10^{-1}$ , uma vez que a porosidade é elevada a terceira potência. O denominador  $(S/V)^2$  da equação 5 reduz a contribuição da variação da porosidade para a permeabilidade uma vez que  $S/V$  cresce proporcionalmente com a porosidade, conforme mostrado na Figura 16.

Portanto, a magnitude da permeabilidade tem raízes na relação entre a área da superfície/volume com a porosidade do *scaffold*, conforme demonstrado na Figura 16, assim como seu comportamento ao longo dos diferentes valores de porosidade se altera dependendo da arquitetura do *scaffold*, conforme descrito por Egan e colaboradores (2017) – os quais obtiveram valores de permeabilidade ( $10^{-8} \text{ m}^2$ ) de 3,1 ( $P = 0,91$ ) para a arquitetura cúbica, 2,8 ( $P = 0,87$ ) para FD-Cube, 0,03 ( $P = 0,81$ ) para BC-Cube, 0,1 ( $P = 0,8$ ) para Octa, 0,03 ( $P = 0,78$ ) para Octet, 0,09 ( $P = 0,79$ ) para V-Octet, 0,11 ( $P = 0,79$ ) para T-Cube e 0,03 ( $P = 0,72$ ) para T-Octa.

Scaglione e co-autores (2014) brilhantemente resumem a dificuldade de se estabelecer um valor alvo para a permeabilidade (e conseqüentemente, de comparar a performance de diferentes *scaffolds*), uma vez que os valores disponíveis na literatura variam em grande escala de amplitude e são muitas vezes dependentes das propriedades dos fluidos utilizados nas medições. Para um mesmo material, a permeabilidade varia de  $0,1 \times 10^{-18}$  a  $2 \times 10^{-18} \text{ m}^2$ , e de um modo geral, valores de  $10^{-17}$  a  $10^{-10} \text{ m}^2$  são encontrados em *scaffolds* de bom desempenho.

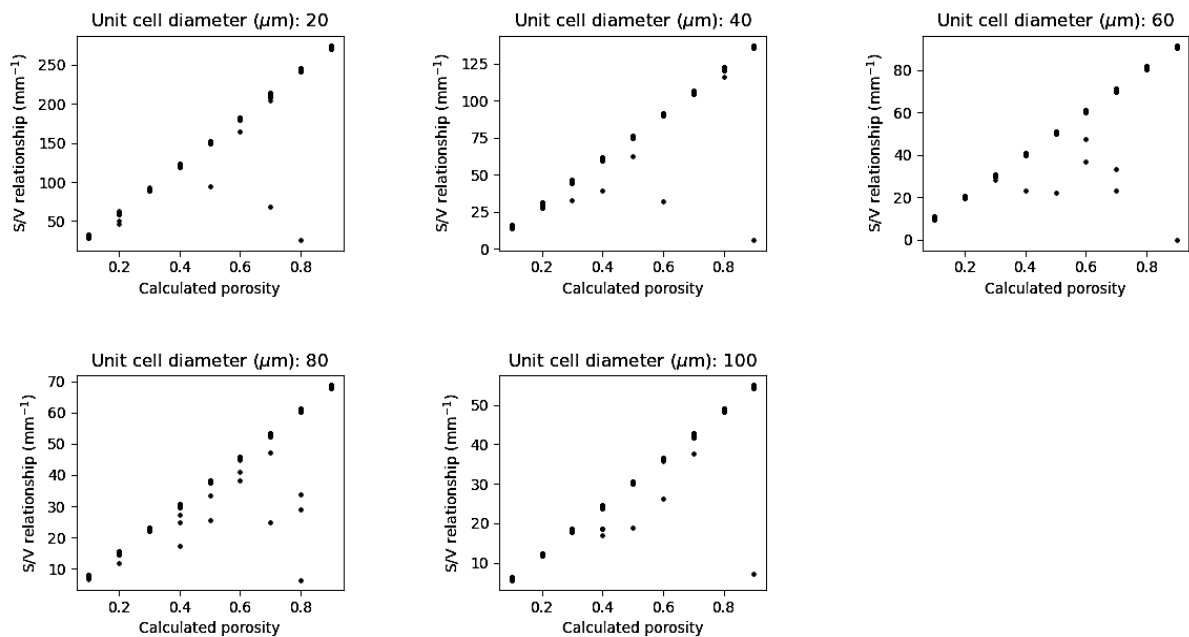
Figura 15 - Intervalo de estabilidade dos valores de permeabilidade versus porosidade



Fonte: Willer Ferreira da Silva Junior, 2021. Os pontos pretos representam os valores de permeabilidade calculados em cada amostragem para diferentes valores de porosidade e  $d$ , enquanto os traços vermelhos representam os limites superior (97,5° percentil) e inferior (2,5° percentil) do intervalo de estabilidade, considerando 95% de confiança. A permeabilidade em diferentes porosidades são consideradas estatisticamente diferentes quando os intervalos de estabilidade não se sobrepõem.

A permeabilidade de *scaffolds* depende, além da sua porosidade, dos tamanhos dos poros e suas geometrias (SCAGLIONE *et al.*, 2014), os quais podem ter um efeito maior que o da porosidade no valor da permeabilidade, como previsto pela Equação 5. Pela Figura 16, percebe-se que *scaffold* com poros menores ( $d = 20$  e  $40 \mu\text{m}$ ) resultam em maior relação área de superfície – volume, reduzindo a permeabilidade do material. Por outro lado, para valores de  $d \geq 60 \mu\text{m}$ , os valores da relação  $S/V$  variam de forma similar (inclusive em magnitude), resultando em permeabilidades de magnitudes próximas. Estas características também explicam as altas permeabilidades encontradas por Egan, Shea e Ferguso (2018) para arquiteturas do tipo Cubo ( $k = 0,22 \times 10^{-8} \text{ m}^2$ ,  $P = 0,50$ ), BC ( $k = 0,30 \times 10^{-8} \text{ m}^2$ ,  $P = 0,52$ ), FX ( $k = 0,19 \times 10^{-8} \text{ m}^2$ ,  $P = 0,49$ ) e FXBC ( $k = 0,25 \times 10^{-8} \text{ m}^2$ ,  $P = 0,51$ ), as quais apresentaram poros acima de  $250 \mu\text{m}$ .

Figura 16 – Razão área de superfície/volume em diferentes valores de porosidade



Fonte: Willer Ferreira da Silva Junior, 2021. Os pontos representam as razões área de superfície/volume nominal calculadas em cada amostragem para cada porosidade calculada.

A razão superfície-volume é um parâmetro importante para a comparação e avaliação de estruturas porosas, sendo que para a aplicação em cultura de tecidos, é esperado que este valor seja maior que 1 para que as células possam aderir às paredes dos poros do *scaffold* para se desenvolverem, multiplicar, locomover, dentre outros comportamentos celulares. Como pode ser visto na Figura 16, os valores obtidos foram da ordem de  $50$  a  $250 \text{ mm}^{-1}$  para *scaffolds* com porosidade igual a  $80\%$  e  $d$  igual a  $100$  e  $20 \mu\text{m}$ , respectivamente.

Diferentemente da relação crescente entre a razão  $S/V$  e porosidade obtida neste

trabalho, a qual pode ser constatada por meio da Figura 16, Egan, Shea e Ferguson (2018) observaram uma relação decrescente entre a razão  $S/V$  e porosidade para *scaffolds* de geometrias Cúbica, BC, FX e FXBC, sendo que a arquitetura FXBC alcançou os maiores valores (uma vez que essa estrutura aumenta significativamente a área de superfície em comparação com a FX ou BC).

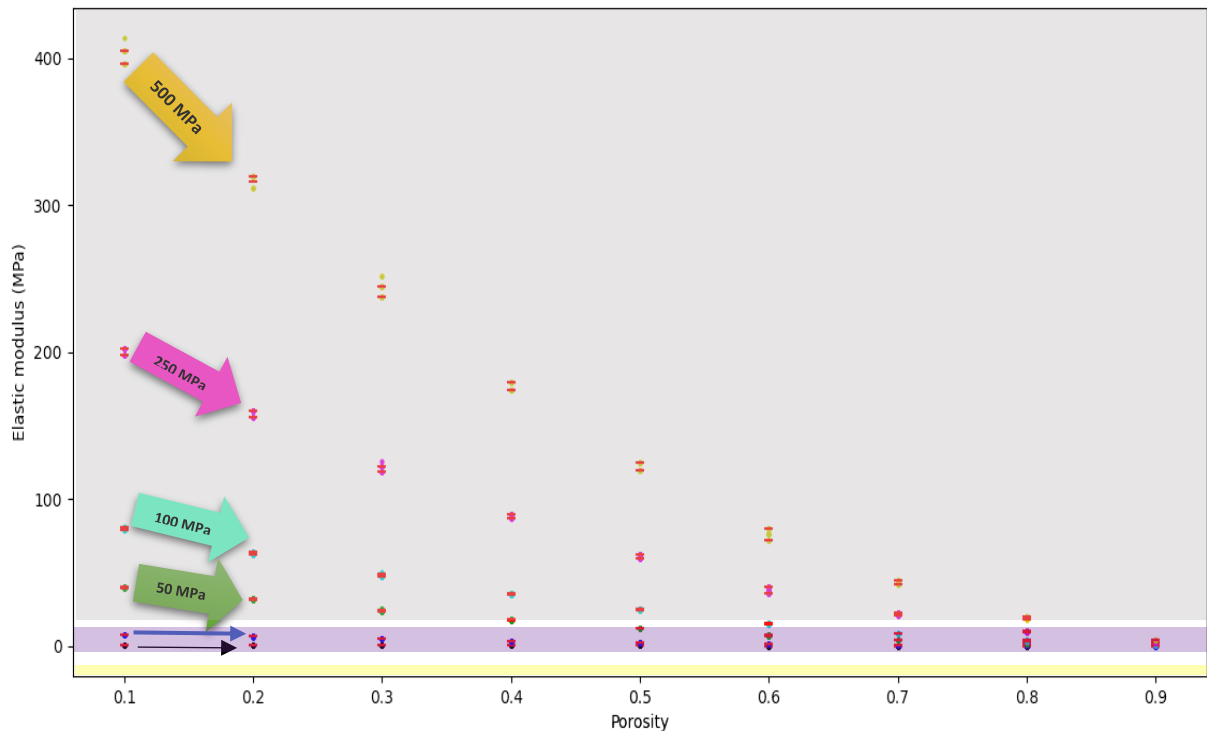
A causa de tal divergência entre os resultados dos dois estudos reside na forma com que as células unitárias são caracterizadas e como a área é calculada. No presente trabalho, uma célula unitária do arcabouço corresponde a um cubo e sua superfície é a soma das faces do cubo vazio (coordenada  $xyz = 0$ ), enquanto no trabalho de Egan, Shea e Ferguson (2018), uma célula unitária cúbica corresponde a um cubo vazio de arestas de diâmetro e comprimento especificados, sendo a sua superfície calculada como o número de voxels (unidades discretas) na interface das camadas que cobrem as arestas do cubo.

Embora o método de modelagem de *scaffold* proposto por Egan, Shea e Ferguson (2018) possibilite o projeto de diferentes arquiteturas, a avaliação de seus desempenhos e suas posteriores impressões, a sua aplicação para o estudo da interação célula-ambiente-*scaffold* pela modelagem baseada em agentes pode ser limitada. Além disso, por se tratar de arquiteturas simétricas, tal modelo gera *scaffolds* com amplitudes restritas de tamanho de poro, reduzindo os efeitos positivos da presença de macro e micro poros na cultura de tecidos. Por outro lado, os métodos de modelagem de *scaffold* e de cálculo da área de superfície propostos no presente trabalho apresentam simplicidade computacional e correspondência direta com o modelo baseado em agentes ao qual ele interage.

Com relação à resistência dos *scaffolds* a Figura 17 mostra o perfil decrescente dessa propriedade com o aumento da porosidade do *scaffold*.

A resistência do *scaffold* aos diferentes tipos de tensão aos quais ele poderá ser exposto após sua implantação no tecido lesionado é de extrema importância para a regeneração do tecido e sucesso do tratamento. Os requerimentos para este parâmetro também varia grandemente, a depender do tipo de tecido/ aplicação no qual o *scaffold* será utilizado - de 9 kPa a 26,5 MPa, para aplicações em tecidos cartilagosos, por exemplo (WASYŁECZKO; SIKORSKA; CHWOJNOWSKI, 2020), sendo que a resistência do arcabouço pode ser grandemente afetada por outras propriedades, tais como arquitetura do *scaffold*, porosidade e tamanho dos poros (EGAN *et al.*, 2017).

Figura 17 - Resistência dos *scaffolds* de diferentes materiais em função da porosidade



Fonte: Willer Ferreira da Silva Junior, 2021. Os traços vermelhos representam os limites superior (97,5° percentil) e inferior (2,5° percentil) do intervalo de estabilidade do módulo de elasticidade de diferentes materiais, considerando 95% de confiança. Os pontos representam o módulo de elasticidade aparente de materiais cujo módulo de Young do material é 1 MPa (●), 10 MPa (●), 50 MPa (●), 100 MPa (●), 250 MPa (●) e 500 MPa (●). As regiões coloridas do fundo do gráfico correspondem aos módulos de elasticidades mais adequados a *scaffolds* aplicados a diferentes tipos de tecidos, para efeito de comparação: a região amarela corresponde a aplicações em tecidos macios – tecido conjuntivo propriamente dito, tecido cerebral (BNID 106646 e 112081), a região roxa a aplicações em tecido cartilaginoso (WASYŁECZKO; SIKORSKA; CHWOJNOWSKI, 2020; BNID 106648) e a região cinza corresponde a aplicações em tecidos ósseos (BNID 106649; HANDORF *et al.*, 2015; GHASSEMI *et al.*, 2018).

Egan e colaboradores (2017) reportaram um decaimento aproximadamente linear do módulo de elasticidade relativo com a porosidade, para as diferentes topologias de poros estudadas (Cubo, FD-Cube, BC-Cube, Octa, Octet, V-Octet, T-Cube e T-Octa). Guarino, Causa e Ambrosio (2007) descrevem um aumento de 0,24 para 1,85 MPa no módulo de elasticidade do *scaffold* (obtido pela técnica de inversão de fase/lixiviação de sal com solução de poli( $\epsilon$ -caprolactona) a partir da redução de sua porosidade de 84,9 para 45,7%. A adoção deste material para aplicação em cultura de tecidos ósseos se baseia no mecanismo específico de degradação do material pela hidrólise das ligações éster, resultando em um tempo de vida do material longo o suficiente para a regeneração do tecido lesionado. Nesse trabalho, o módulo de elasticidade medido não só foi maior no arcabouço com o menor tamanho de poro (150 - 212  $\mu\text{m}$ ), como os dados experimentais se mostraram mais próximos dos estimados pelo modelo empírico para células unitárias cúbicas abertas.

A resistência do *scaffold* aos diferentes tipos de tensão aos quais ele poderá ser exposto após sua implantação no tecido lesionado é de extrema importância para a regeneração do tecido e sucesso do tratamento. Os requerimentos para este parâmetro também varia grandemente, a depender do tipo de tecido/ aplicação no qual o *scaffold* será utilizado - de 9 kPa a 26,5 MPa, para aplicações em tecidos cartilagosos, por exemplo (WASYŁECZKO; SIKORSKA; CHWOJNOWSKI, 2020), sendo que a resistência do arcabouço pode ser grandemente afetada por outras propriedades, tais como arquitetura do *scaffold*, porosidade e tamanho dos poros (EGAN *et al.*, 2017).

Egan e colaboradores (2017) reportaram um decaimento aproximadamente linear do módulo de elasticidade relativo com a porosidade, para as diferentes topologias de poros estudadas (Cubo, FD-Cube, BC-Cube, Octa, Octet, V-Octet, T-Cube e T-Octa). Guarino, Causa e Ambrosio (2007) descrevem um aumento de 0,24 para 1,85 MPa no módulo de elasticidade do *scaffold* (obtido pela técnica de inversão de fase/lixiviação de sal com solução de poli( $\epsilon$ -caprolactona) a partir da redução de sua porosidade de 84,9 para 45,7%. A adoção deste material para aplicação em cultura de tecidos ósseos se baseia no mecanismo específico de degradação do material pela hidrólise das ligações éster, resultando em um tempo de vida do material longo o suficiente para a regeneração do tecido lesionado. Nesse trabalho, o módulo de elasticidade medido não só foi maior no arcabouço com o menor tamanho de poro (150 - 212  $\mu\text{m}$ ), como os dados experimentais se mostraram mais próximos dos estimados pelo modelo empírico para células unitárias cúbicas abertas.

Lin e colaboradores (2007) avaliaram as propriedades mecânicas de *scaffolds* cilíndricos com 3 arquiteturas periódicas ortogonais tridimensionais. As arquiteturas foram projetadas utilizando software de modelagem sólida Unigraphics NX4 3D e fabricadas utilizando fosfato de  $\beta$ -tricálcio. Os autores encontraram valores de  $E$  para as 3 arquiteturas de 15,38 MPa, 28,57 MPa e 48,7 MPa e um perfil decrescente (aproximadamente exponencial) do módulo de elasticidade com o aumento da porosidade.

Dessa forma, o comportamento do módulo de elasticidade dos *scaffolds* em função de porosidade variável observado na Figura 17 é condizente com os resultados descritos na literatura, para arcabouços fabricados com materiais de diferentes módulos de Young, indicando que a Equação 8 é adequada para a simulação de  $E$  da arquitetura gerada pelo algoritmo do presente trabalho. A Figura 17 também mostra que o impacto da porosidade na resistência do *scaffold* é tanto maior quanto mais resistente for o material, e que os módulos de elasticidade obtidos para diferentes materiais a 90% de volume vazio não possuem diferença estatística significativa. Assim, é possível variar o módulo de elasticidade máximo do *scaffold*

de (aproximadamente) 80 MPa a 0,9 MPa na faixa de porosidade geralmente aplicada para materiais para tecidos conjuntivos (60 a 90%).

Portanto, por meio dos resultados obtidos, é possível afirmar que o programa desenvolvido é capaz de produzir uma estrutura tridimensional porosa, de poros conectados de modo aleatório, a qual pode ser utilizada no projeto de modelagem baseada em agentes de engenharia de tecidos. Tamanhos de células unitárias de 20 a 40  $\mu\text{m}$ , junto a porosidade teórica entre 60 e 90% devem fornecer *scaffolds* com macro e micro poros interconectados, área de superfície interna elevada, sem afetar consideravelmente a permeabilidade de fluidos e substâncias relevantes para a cultura de células, possibilitando rápido desenvolvimento do tecido. Nessa faixa de porosidade, também é possível obter estruturas com ampla faixa de módulo de elasticidade, necessários para as diferentes aplicações de tecidos conjuntivos cartilaginoso e ósseo.

## 5.2 ANÁLISE DOS PRINCIPAIS EFEITOS E COMPONENTES

Devido às limitações computacionais associadas à (provável) incompatibilidade do processador do computador utilizado nas simulações com a complexidade do modelo, não foi possível obter os resultados dos indicadores de desempenho e complexidade (item 4.3.1) em 23 dos 38 (~ 61% do total) experimentos *in silico* propostos na Tabela 4. Devido ao número de agentes (principalmente glicose e oxigênio) criados a cada tempo  $t_m$  nessas condições de simulação, a complexidade do sistema e esforço computacional aumentou consideravelmente durante as simulações (limitações de escalonamento do modelo), sendo estimado que, para se completar as 3 replicatas ao longo das 504 iterações celulares (com 60 iterações moleculares, cada) para o experimento n° 19 (Tabela 4), por exemplo, seria necessário mais de uma semana, o que inviabilizaria a execução do projeto.

O tempo de simulação de sistemas complexos por modelos baseado em agentes pode ser reduzido pelo uso de pacotes de ferramentas desenvolvidas para ABMs e processadores mais eficientes acoplados a grande capacidade de memória. Yu e Bagheri (2020), por exemplo, utilizaram a plataforma ARCADE (representação de células e ambientes dinâmicos baseada em agentes), desenvolvida em Java com uso da biblioteca MASON para simulação e agendamento multiagentes, para estudar fenômenos emergentes na dinâmica populacional de células (agentes) com diferentes complexidades metabólicas e de sinalização celular, bem como os efeitos de competição entre células de perfis fenotípicos heterogêneos e a dinâmica de desenvolvimento desse tipo de população. Os autores estimaram que, para uma simulação de



14 dias, correspondente a 20.160 *ticks* (chamado de  $t_n$ , no presente trabalho) foram necessários 5 a 10 min do tempo de um CPU com processador Intel R Core i7 (8x 3.40 GHz) e 19.5 GB de memória RAM.

A complexidade e esforço computacional da simulação de cultivo de tecidos em perfusão pelo presente modelo baseado em agentes também são consideravelmente maiores que os de cultivo em modo estático (batelada). A título de ilustração, em uma simulação realizada utilizando as condições: *scaffold* de 125 voxels ( $d = 20 \mu\text{m}$ ), porosidade de 60% (o que resulta em um volume vazio de  $8,64 \times 10^{-5}$  mL), tempo de duplicação celular de 21 h, concentração inicial de células =  $0,00000211$  células/ $\mu\text{m}^3$  (correspondente a  $2,11 \times 10^6$  células/mL),  $p\text{O}_2 = 38$  mmHg, concentração inicial de glicose =  $3340000$  moléculas/ $\mu\text{m}^3$ , durante 10 iterações celulares ( $t_n$ ), o tempo (computacional) de completude do processo em perfusão foi 716% maior que o tempo (computacional) do processo em batelada. Pela perspectiva do conceito de complexidade computacional, como conteúdo de informação algorítmica (GOMES, *et al.*, 2019) e requerimento computacional para solução de processos matemáticos (CLARK; JACQUES, 2012), percebe-se que a simulação da cultura de tecidos em perfusão é mais complexa que no modo estático.

Nos últimos anos, alguns autores têm discutido os problemas de escalonamento de modelos baseado em agentes, suas principais causas e possíveis soluções. Lysenko e D'souza (2008) fazem uma interessante análise dos principais aspectos que limitam o escalonamento de ABMs, ressaltando que os pacotes de ferramentas (*toolkits*) tradicionalmente usados na construção dos modelos não comportam o processamento de inúmeros comandos para grandes volumes de agentes devido a execução seriada desses comandos e consumo de memória. Segundo os autores, algumas soluções já utilizadas são: 1) o uso de processadores paralelos, em que clusters de agentes são executados em processadores diferentes que trocam informações entre si para promover a interação entre os grupos de agentes e 2) compressão de agentes, na qual agentes de mesma característica são representados por um agente no modelo e um fator de expansão é utilizado para representar o número real de agentes. Essa última estratégia foi utilizada no presente modelo (por meio do fator de redução) para os agentes do tipo molécula.

Utilizando algoritmos para simulação de ABMs em arquiteturas de computação de dados em paralelo, por meio de Unidade de Processamento Gráfico (GPU), Lysenko e D'souza (2008) aumentaram a velocidade de simulação de ABMs em 9000 vezes em comparação com modelos desenvolvidos em unidades de processamento central (CPU) com pacotes de ferramentas de programação tradicionais, além de simularem mais de 1 milhão de agentes. Este resultado é bastante relevante e promissor, pois os autores abordaram as principais

funções/regras de comportamento geralmente utilizadas em ABMs (como no presente trabalho) para cultura de células e tecidos, tais como: manipulação de agentes móveis, atualização de ambientes baseados em malhas/treliças, comunicação entre agentes, multiplicação de agentes, visualização do processo e métodos para análises estatísticas.

Seekhao e colaboradores (2016) testaram diferentes combinações de agendamento de tarefas e simulação de ações de agentes por CPU (simples ou múltiplos processadores) e ou GPU, e obtiveram um aumento de velocidade de 35 vezes na simulação do modelo (baseado no número total de rotinas executadas por unidade de *tick*), quando comparado com a simulação do ABM de inflamação e cicatrização de feridas em de pregas vocais em processador CPU único. Os processadores utilizados no estudo foram o 16-core Intel(R) Xeon(R) E5-2690 CPU e NVIDIA Tesla K20c GPU.

Por meio dessa estratégia, os autores conseguiram executar o programa na plataforma NetLogo com 1 milhão de *patches* (unidade similar aos voxels, do presente trabalho) e 500.000 células iniciais, cujas regras de comportamento incluem secreção de fatores de crescimento e citocinas por trombócitos para atrair células do sistema imune, secreção de fatores de necrose tumoral (TNF) por neutrófilos para atração de neutrófilos e macrófagos, secreção de TNF, fator de crescimento e citocinas por macrófagos e fibroblastos para atrair neutrófilos, macrófagos e fibroblastos, produção de MEC por fibroblastos.

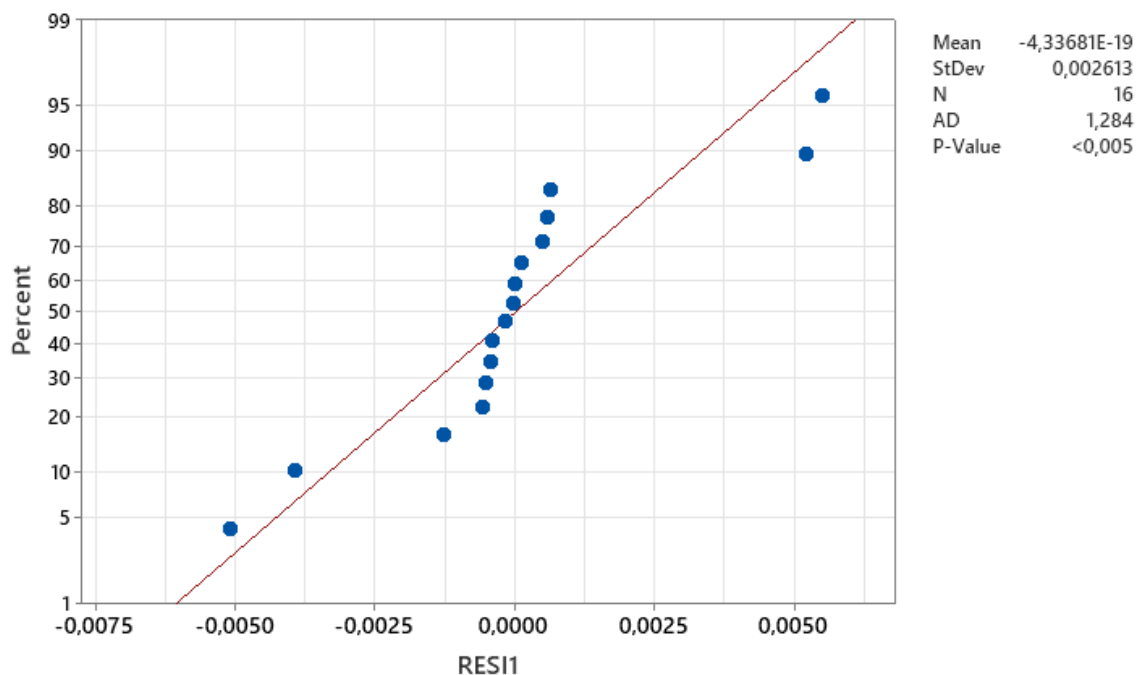
Por fim, Seekhao e colaboradores (2016) demonstraram que a maior parte do tempo (mais de 50%) requerido para executar todas as tarefas de cada *tick* em processador CPU simples (cenário do presente trabalho), é gasto em rotinas de cálculo de difusão das moléculas mimetizadas no modelo, considerando um espaço bidimensional. Devido a esse resultado, os autores sugerem que as rotinas relacionadas às moléculas sejam executadas em um GPU, enquanto as rotinas de células podem ser executadas em CPU.

De fato, modelos baseado em agentes de alta complexidade desenvolvidos nas últimas décadas para abarcar os diferentes níveis e componentes de sistemas biológicos têm sido simulados em processadores com maior velocidade de processamento e capacidade de armazenamento de dados. Matyjaszkiewicz e colaboradores (2017) executaram as rotinas do programa BSim 2.0 - ABM para modelagem dinâmica de bactérias em ambientes experimentais típicos, incluindo quimiostatos – em dois processadores Intel®Xeon®E5-2630 v3 CPUs com 64Gb de memória RAM. O programa *Timothy*, software livre para simulação de dinâmica de colônias de até  $10^9$  células, foi implementado por Cytowski e colaboradores (2017) utilizado Intel Xeon Phi coprocessador x100 e Intel Xeon Phi x200 contendo até 72 núcleos. Germann, Marin-Riera e Sharpe (2019) implementaram o programa ya||a, desenvolvido para a modelagem

baseada em agentes de alto desempenho de morfogênese em larga escala (mais de 40.000 agentes), em um processador GPU Intel i7-4770 @ 3.40GHz, NVidia GeForce GTX 1060 6GB, evidenciando a superioridade do desempenho do ya||a em comparação com os programas Chaste e EmbryoMaker, especialmente quando os modelos foram escalonados.

A impossibilidade de se completar todos os experimentos *in silico* do planejamento experimental inviabilizou a análise completa dos componentes principais, seus efeitos e as interações entre os fatores nas faixas de trabalho propostas para o modelo, uma vez que os pressupostos do método estatístico não foram atendidos (design não ortogonal, coeficientes de determinação ajustado –  $R^2_{adj}$  - do modelo de regressão multivariada menores que 50% e distribuição não normal dos resíduos da estimativa do modelo) para nenhum dos indicadores de desempenho e complexidade (taxa de ocupação celular, taxa de ocupação por MEC, taxa de crescimento específico média, complexidade energética média e máxima). Embora o ajuste do modelo de regressão multivariada para o indicador taxa de crescimento tenha apresentado um alto valor de  $R^2_{adj}$  (87,12%), o teste de hipótese de Anderson-Darling de normalidade dos resíduos do modelo (Figura 18) mostra que os resíduos não são normais (p-valor < 5%), uma vez que a hipótese nula do teste é de que os dados pertencem a uma distribuição normal.

Figura 18 - Distribuição de probabilidade de normalidade dos resíduos



Fonte: Willer Ferreira da Silva Junior, 2021

O comportamento dos resíduos apresentado na Figura 18 indica que há variáveis não identificadas no modelo (MINITAB, 2021), o que está coerente com o fato de que o a

concentração inicial de glicose e o limite de ocupação de espaço vazio não puderam ser avaliados pelo método estatístico por falta de resultados dos indicadores em níveis diferentes desses dois fatores.

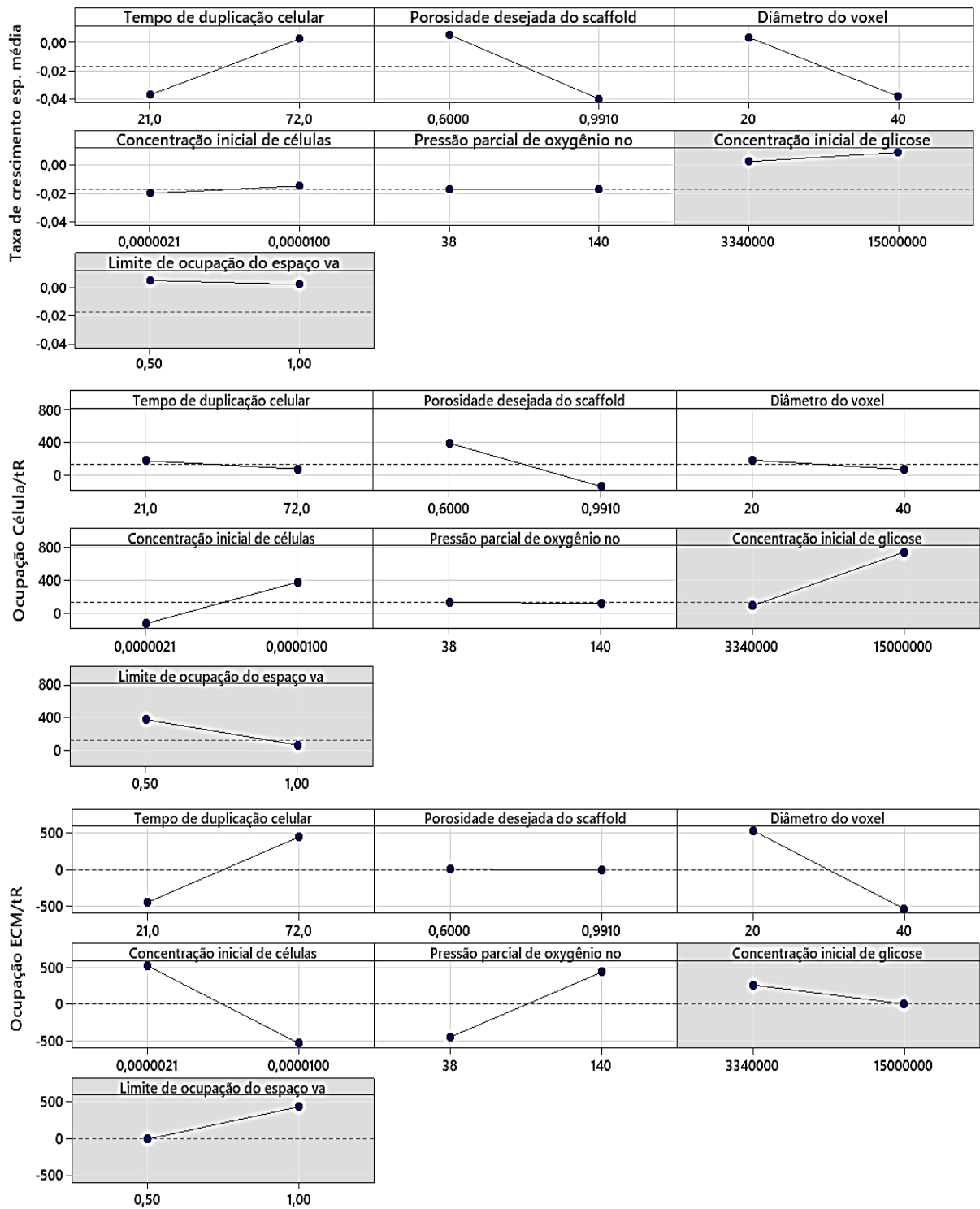
Devido a esse impasse, os efeitos dos parâmetros descritos na Tabela 3 sobre o comportamento da resposta do modelo (medido pelos indicadores de desempenho e complexidade do sistema modelado) são apresentados abaixo de forma qualitativa, para demonstrar a tendência de comportamento dos indicadores frente a variação dos parâmetros variáveis em uma faixa de trabalho diferente da proposta na Tabela 3 e portanto, não representam conclusões estatísticas. A Figura 19 mostra a variação dos indicadores de desempenho frente às mudanças nos parâmetros variáveis, em torno do ponto central (nível 0).

De modo geral, a taxa de crescimento específico, ocupação do espaço vazio por células e por MEC apresentaram uma relação inversa à porosidade e diâmetro do voxel, baseado nos dois extremos avaliados – ou seja, 20 e 40  $\mu\text{m}$ , 60 e 99,1%. No contexto de cultura de tecidos *in vitro*, o mesmo comportamento pode ocorrer e estar relacionado ao modo como esses parâmetros se relacionam com a área de superfície, a qual possui grande relevância para a adesão e proliferação celular. A Figura 20 mostra que, para o *scaffold* gerado pelo algoritmo desenvolvido no presente trabalho, a área de superfície é maximizada com voxels de diâmetro igual a 20  $\mu\text{m}$ , o qual resulta em poros de tamanhos de 40 a 340  $\mu\text{m}$  na faixa de porosidade avaliada de 60 a 90% (Figura 13).

Dinescu e colaboradores (2019), por exemplo, verificaram que os altos valores de área de superfície dos *scaffolds* de quitosana-óxido de grafeno 3% promoveram a diferenciação osteogênica *in vitro* de células-tronco derivadas de tecido adiposo humano (hASC) cultivadas por 28 dias, e a reparação óssea *in vivo* em modelos de camundongos avaliados por 18 semanas. O uso de *scaffold* de quitosana-óxido de grafeno 3% também resultou nos mais altos níveis de marcadores osteogênicos, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, bem como na maior produção de MEC pelas células.

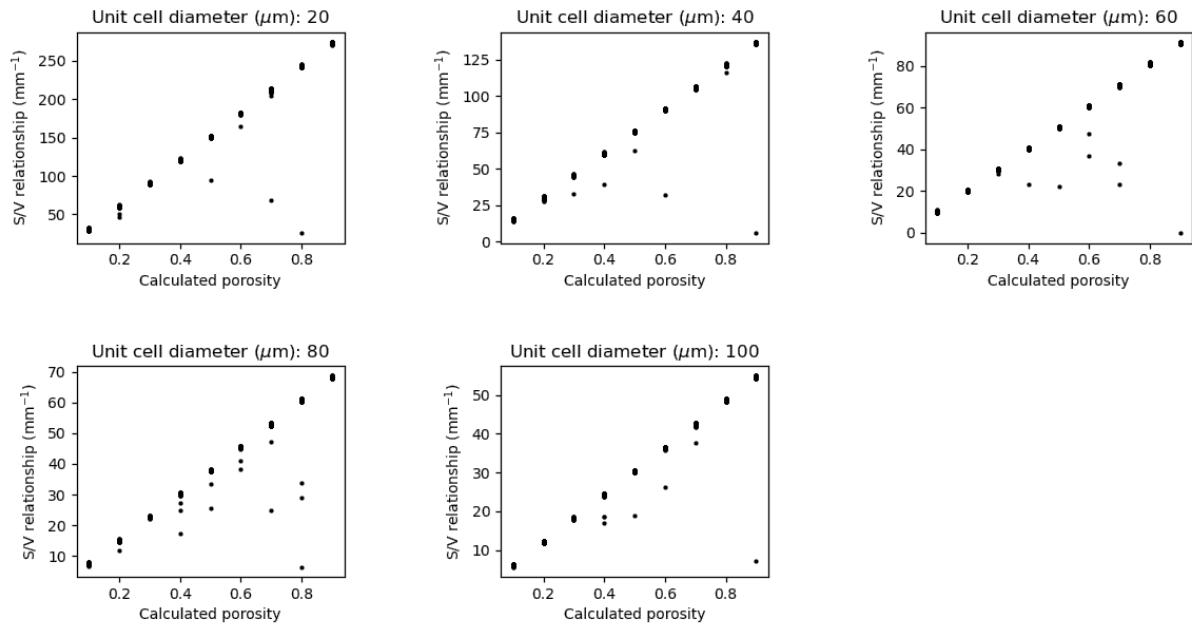
Lien, Ko e Huang (2009) reportam que os maiores níveis de produção de MEC e glicosaminoglicanos (GAG) por condrócitos isolados das articulações de ombros, cotovelos e quadris de ratos Wistar foram encontrados em *scaffolds* de gelatina com ligações cruzadas promovidas por genipina cujo tamanhos de poro eram 250 – 350 e 350 – 500  $\mu\text{m}$ . Os *scaffolds* com esses tamanhos de poros também resultaram em maiores taxas de crescimento celular e expressão de genes marcadores para agrecanos, colágeno tipo I, colágeno tipo II e colágeno tipo X, quando esses resultados foram comparados com os de *scaffolds* de poros de 50 – 150  $\mu\text{m}$ , por exemplo.

Figura 19 - Indicadores de desempenho vs parâmetros variáveis



Fonte: Willer Ferreira da Silva Junior, 20121. Os parâmetros dos quadros cinzas não puderam ser avaliados no modelo por falta de dados suficiente.

Figura 20 - Variação da área de superfície com a porosidade e diâmetro do voxel

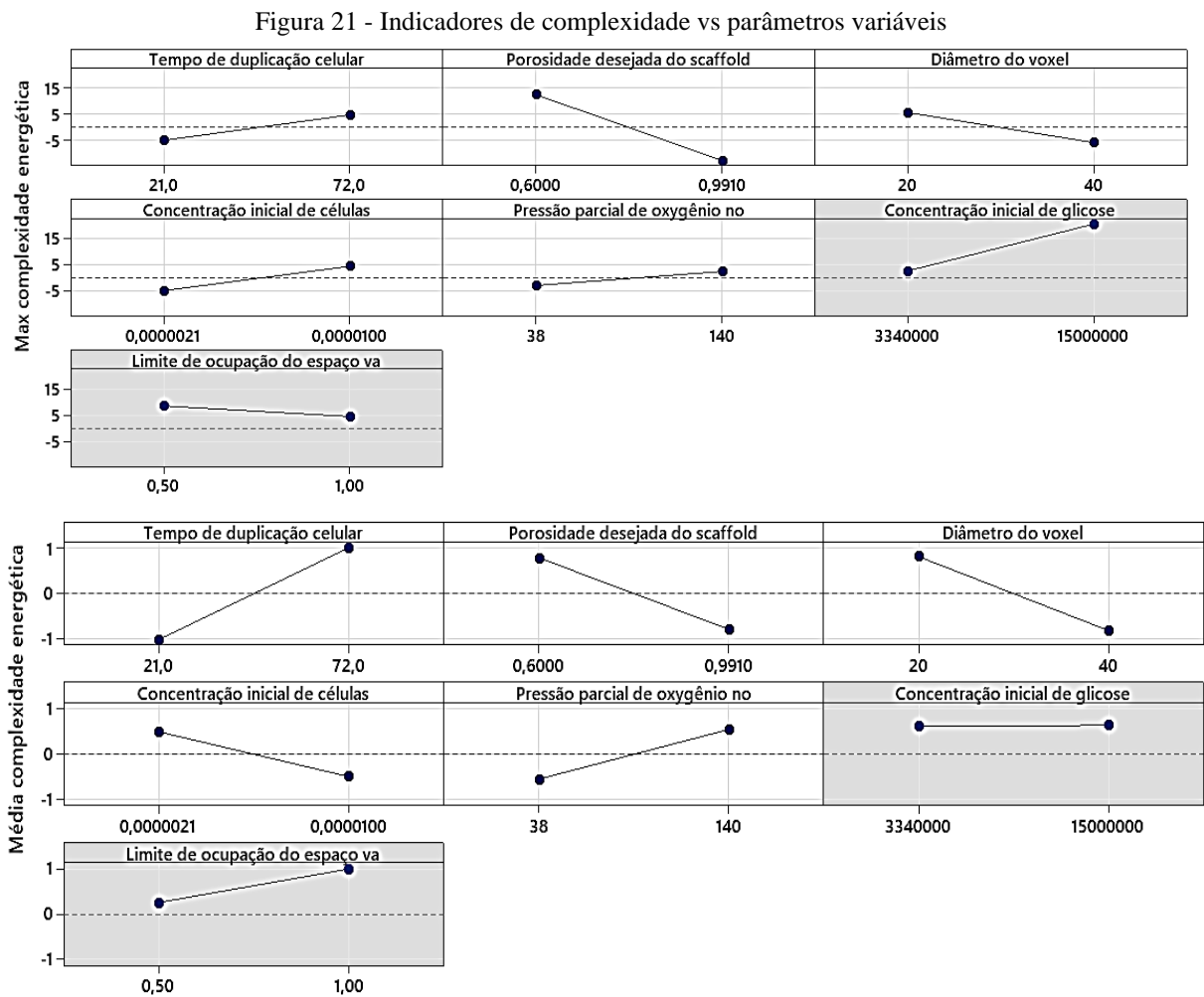


Fonte: Willer Ferreira da Silva Junior, 2021.

Murphy e O'brien (2010) avaliaram o efeito do tamanho médio de poros e área de superfície de *scaffolds* de colágeno-glicosamina inoculados com osteoblastos na formação de tecido ósseo. Os resultados mostraram que, embora *scaffolds* com poros menores (85 – 120 μm) favoreçam maior adesão celular no primeiro dia de cultivo, devido a suas maiores áreas de superfície, esse efeito inicial é superado após longos períodos de cultivo do tecido (após 7 dias), no qual as maiores densidades celulares são obtidas em *scaffolds* com poro médio de 325 μm, o qual é aproximadamente o tamanho mínimo recomendado para a vascularização de tecido ósseo.

Nava e colaboradores (2016) perceberam um aumento significativo de até 50% na densidade de condrócitos articular bovinos cultivados em *scaffolds* de carbonato poli-L-lactida-co-trimetileno de tamanho de poro médio de 175 μm (porosidade = 87%), quando comparado com os resultados de *scaffolds* com poro médio de 75 μm (porosidade = 71%). O tecido foi avaliado por 2 semanas e após esse período, percebeu-se que a atividade metabólica celular e síntese de MEC diminuíram significativamente em até 40% com o tamanho dos poros (75 a 175 μm). Esses resultados mostram que os tamanhos de poros do *scaffold* gerados pelo algoritmo do presente trabalho com  $d = 20 \mu\text{m}$  correspondem às condições de obtenção de maior densidade celular - em cultivo de tecidos ósseos e cartilagosos - encontradas na literatura.

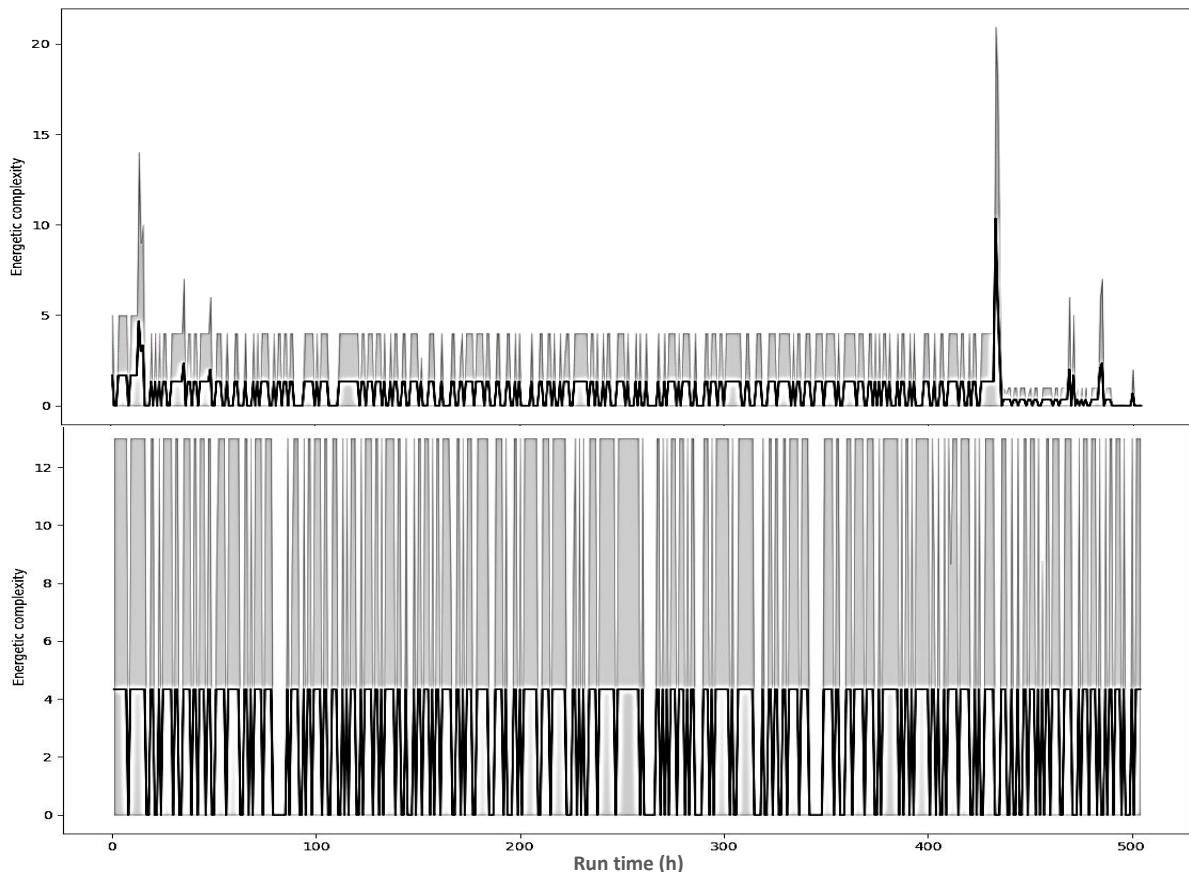
Do ponto de vista da complexidade energética do sistema modelado ao nível da função célula-tecido, a mesma relação qualitativa foi observada entre os indicadores de complexidade, diâmetro de voxel e porosidade. Embora os indicadores de complexidade se relacionem de certa forma com os de desempenho (ocupação do espaço vazio por células e por MEC), eles diferem entre si, uma vez que os indicadores de complexidade energética não levam em consideração o tempo que as células levam para realizar transferências de energia ativada. A complexidade energética máxima indica em quais condições de cultivo as células executam a maior quantidade de ações relevantes para a formação do tecido (no contexto do presente modelo), enquanto a complexidade energética média indica tendência média de ocorrência dessas ações no sistema ao longo do processo. A Figura 21 mostra a variação dos indicadores de complexidade.



Fonte: Willer Ferreira da Silva Junior, 20121. Os parâmetros dos quadros cinzas (limite de ocupação de espaço vazio e concentração inicial de glicose) não puderam ser avaliados no modelo por falta de dados suficientes.

Em geral, condições de cultivo mais favoráveis à proliferação celular (maior disponibilidade de nutriente, por exemplo) resultarão em uma complexidade energética máxima maior. Por outro lado, pela Figura 21 é possível perceber que algumas condições que em teoria promoveriam uma proliferação celular mais rápida (menor tempo de duplicação e maior concentração inicial de células) podem não resultar em transferências energéticas no sistema ao nível de função célula-tecido ao longo do processo. A Figura 22 ilustra tais observações. Uma vez que não foi possível determinar os componentes principais do modelo, não é possível concluir sobre as causas de tais observações, uma vez que as supostas relações de proporcionalidade podem ter causas aleatórias ou advir de interações de primeira e/ou segunda ordem entre os fatores.

Figura 22 - Complexidade energética medida a cada unidade de tempo  $t_n$



Fonte: Willer Ferreira da Silva Junior, 2021. O gráfico superior corresponde às condições de cultivo da simulação n° 9 da Tabela 4 (menor tempo de duplicação e maior concentração inicial de células), enquanto o gráfico inferior corresponde às condições de cultivo da simulação n° 1 (maior tempo de duplicação, menor concentração inicial de células). As linhas sólidas representam o valor médio calculado a cada unidade de tempo e as áreas sombreadas representam o intervalo de confiança de 95%.

Ao longo da revisão bibliográfica realizada para o desenvolvimento deste projeto, não foram encontrados trabalhos em que a complexidade do sistema biológico tenha sido medida,



o que pode ser resultado tanto das divergências ainda existentes em como medir a complexidade de sistemas (GOMES *et al.*, 2019) quanto pela ainda recente integração entre as áreas de Teoria de Sistemas Complexos e Engenharia de Tecidos. Os trabalhos até então publicados na literatura que unem os conhecimento de sistemas complexos e engenharia de tecido têm focado majoritariamente na aplicação de modelos discretos (p. ex., ABMs) ou abstração do conceito de complexidade para estudo da dinâmica da cultura de células e tecidos (YU; BAGHERI, 2020).

### 5.3 AVALIAÇÃO DA REPRODUÇÃO DO COMPORTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS *IN VITRO*

Após a conclusão da simulação das condições de cultivo de células estaminais humanas derivadas de medula óssea (hBMSCs) em *scaffold* tridimensional nos modos perfusão e estático (batelada) foi possível verificar que o presente modelo baseado em agentes reproduziu alguns dos resultados encontrados por Lovecchio e colaboradores (2019). Além disso, comportamentos celulares típicos de cultura de células em batelada e perfusão também foram observados, conforme detalhado a seguir.

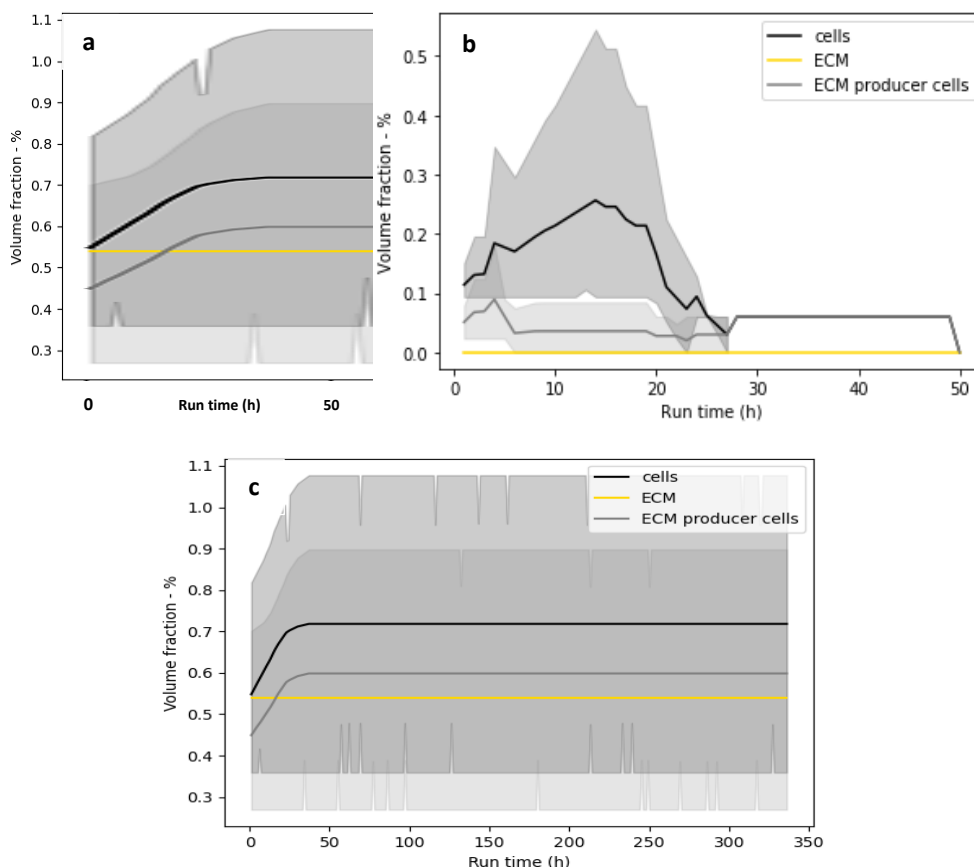
A Figura 23 mostra que, assim como demonstrado por Lovecchio e colaboradores (2019), o cultivo em perfusão de tecidos, por meio de células crescidas em *scaffolds*, apresenta uma densidade celular significativamente (p-valor < 5%) superior à observada em cultivo estático (batelada) - superior a 5 vezes a densidade celular do modo estático -, mesmo quando a concentração de glicose no meio de cultura de alimentação é menor que o do meio de expansão celular. Os autores também relataram maior produção e mineralização de matriz extracelular no cultivo em perfusão, quando comparado com o modo estático, o que também pode ser observado na Figura 23.

Nesta figura, o aumento do volume ocupado por células produtoras de MEC logo no início do cultivo indicam a presença de um ambiente favorável à produção de MEC e proliferação celular, nas primeiras horas. Após 24 h de cultivo, o crescimento celular foi mantido em regime estacionário (observado pela presença de um platô), provavelmente pela regulação por disponibilidade de nutrientes no microambiente.

Estes comportamentos são esperados para cultivos em perfusão, sendo relatado tanto em experimentos *in vitro* (AHMED *et al.*, 2019), quanto *in silico* (MOKHTARI-JAFARI *et al.*, 2019). Cheng e colaboradores (2006), Chung e co-autores (2010) e Yan, Bergstrom, e Chen (2012), por exemplo, descrevem em seus trabalhos que tanto a fração célula-volume vazio

quanto o número de células aumentam ao longo do tempo, atingindo um platô a medida que os poros do *scaffold* são completamente ocupados pelas células.

Figura 23 – Fração de volume disponível no *scaffold* ocupado por células e MEC



Fonte: Willer Ferreira da Silva Junior, 2021. Cultivo em perfusão (c) - durante todo o período de sobrevivência das células; (a) mostra uma ampliação das 50 primeiras horas do cultivo em perfusão - e batelada (b). As linhas sólidas representam a média dos resultados das três replicatas, enquanto as áreas sombreadas correspondem ao intervalo de confiança de 95% dos dados.

Inúmeros trabalhos descritos na literatura demonstram que o desempenho e densidade celular em cultivos de tecido e células em perfusão são superiores aos obtidos em cultivos estáticos, o que torna esse regime de operação preferido não só pelo rendimento final de células, mas pela redução de formação de necrose no tecido (AHMED; CHAUHAN; GHAEMMAGHAMI; AYLOTT, 2019; MOKHTARI-JAFAR *et al.*, 2016).

Reatores de perfusão também são preferidos por induzir maior diferenciação celular e promover maior homogeneidade da distribuição das células no *scaffold*, quando comparados com outros reatores que possibilitam o cultivo em regime contínuo – *spinner flask* e *rotating wall*. Além disso, em alguns trabalhos, foi também observada maior expressão dos marcadores de diferenciação fosfatase alcalina, osteocalcina e o fator de transcrição Runx2 em células

ósseas e maior mineralização do *scaffold* em culturas de tecido ósseo em reatores de perfusão - quando comparado com os demais tipos de reatores (BARTIS; PONGRACZ, 2011). Essa superioridade na qualidade da formação do tecido se deve à melhor transferência de massa proporcionado pelo reator de perfusão, embora uma taxa de perfusão ótima deva ser encontrada para que os efeitos deletérios da força de cisalhamento não prejudiquem o cultivo.

Avaliando-se a caracterização do *scaffold* de quitosana-óxido de grafeno 3% (m/m) – o qual foi utilizado por Lovecchio e colaboradores (2019) – feita por Dinescu e colaboradores (2019), é possível perceber que os tamanhos de poros ( $50 - 100 \mu\text{m}$ ), porosidade ( $76,4 \pm 4,82\%$ ) e área de superfície ( $181 \pm 80 \text{ mm}^{-1}$ ) identificados pelos autores encontram-se dentro ou interseccionam as faixas de tamanhos de poros ( $\sim 60 - 280 \mu\text{m}$ ), porosidade (76,4%) e área de superfície ( $\sim 200 \text{ mm}^{-1}$ ) estimados para o *scaffold* gerado pelo algoritmo desenvolvido no presente trabalho, utilizando  $d = 20 \mu\text{m}$ . Além disso, a espessura do *scaffold* fabricado por Lovecchio e colaboradores (2019) foi de  $20,3 \pm 4,32 \mu\text{m}$ , valor este próximo a comprimento de voxel selecionado nas simulações do modelo.

Esses dados são de extrema importância, pois demonstram que as escalas temporal e espacial do modelo, bem como a relação entre e os agentes, foram adequadamente definidas pela análise realizada e detalhada na Tabela 7. De acordo com Glen e colaboradores (2019) as escalas temporais e espaciais estão geralmente relacionadas e possuem forte influência na capacidade do modelo em reproduzir os padrões comportamentais do sistema estudado, afetando as interações entre agentes e seus deslocamentos.

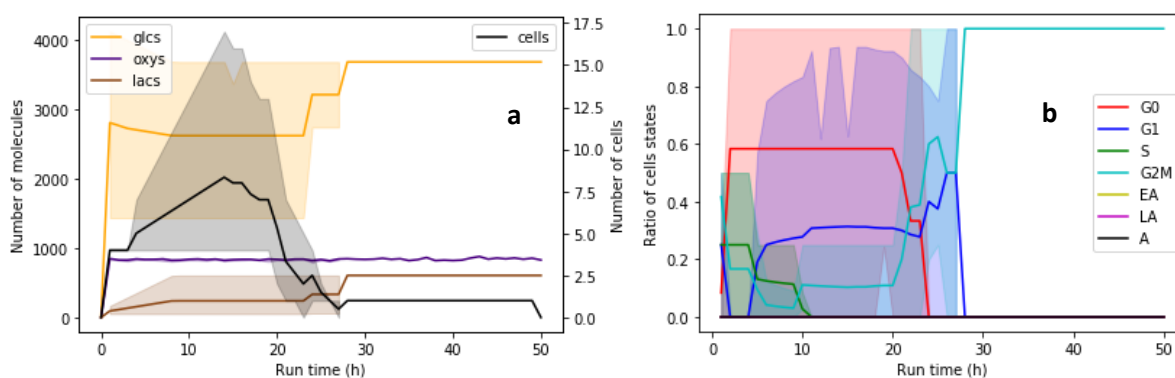
Por outro lado, o modelo baseado em agentes mostrou-se mais sensível às condições do ambiente que o experimento *in vitro*, uma vez que no primeiro, todas as células morreram após 2 dias de cultivo estático, enquanto no segundo, foi detectada uma baixa densidade de células viáveis após 14 dias de cultivo. A principal hipótese é a de que tal resultado foi ocasionado pela adoção de um limite crítico de lactato inadequado para os agentes modelados com parâmetros de células hBMSCs, uma vez que o valor de referência utilizado pertence a células do tipo CHO, e não são definidos claramente valores de concentrações críticas de lactato para outras linhagens celulares na literatura.

A Figura 24 reitera essa hipótese, onde pode ser vista a disponibilidade de nutrientes, mesmo no período de proliferação celular (a esquerda), enquanto mais da metade das células encontrava-se no estado quiescente (G0). Tal fato, somado ao crescente número de moléculas de lactato junto à fase exponencial de crescimento exponencial, indica que o acúmulo de lactato nos microambientes das células atingiu níveis iguais ou maiores que o limite crítico de lactato empregado na simulação. Experimentalmente, Sánchez-De-Diego e coautores (2019)

mostraram que lactato é acumulado tanto em 24 horas de cultivo de osteoblastos (linhagem IDG-SW3) quanto após 24 dias de diferenciação dos osteoblastos, sendo esse acúmulo tão maior quanto maior for a concentração de glicose no meio.

Estudos recentes também têm demonstrado que o lactato não só é produzido na presença de oxigênio – em osteoblastos, e células cancerígenas, por exemplo (LEE *et al.*, 2017), como também é consumido como fonte de energia por diversas linhagens celulares – CHO, neurônios, células musculares, do tecido ósseo e do fígado (RABINOWITZ; ENERBÄCK, 2020; KANE, 2014, FERGUSON *et al.*, 2018), o que tem promovido a rediscussão da visão tradicional sobre o lactato como um agente prejudicial para o crescimento celular e desenvolvimento de tecidos.

Figura 24 - Cinética de cultivo celular e variação do ciclo celular da população de células



Fonte: Willer Ferreira da Silva Junior, 2021. Gráfico de cinética de crescimento das células em modo estático (batelada) (a); Fração de células que se encontram em cada fase do ciclo celular ao longo do cultivo no modo estático (b). Em (a), glcs (--) significa número de moléculas de glicose, oxys (--) significa número de moléculas de oxigênio, lacs (--) significa número de moléculas de lactato e cells (--) significa número de células. Em (b), as abreviações da legenda significam a percentagem de células em cada etapa do ciclo celular (G0, G1, S, G2M, EA: apoptose precoce, LA: apoptose tardia, A: apoptose).

Devido a esses resultados instigantes – obtidos tanto neste trabalho quanto em experimentos descritos na literatura e citados anteriormente -, uma simulação nas mesmas condições de cultivo estático (conforme descrito no item 4.3.2) foi realizada, alterando o critério de decisão da avaliação das condições do ambiente baseado na concentração crítica de lactato, pelo pH do microambiente.

A motivação teórica dessa investigação foi de que, dadas as inúmeras evidências do uso do lactato como fonte energética, sua importância como molécula sinalizadora e responsável pela eficiência energética do catabolismo da glicose, os impactos deletérios do seu acúmulo para o crescimento celular, devem-se à redução acentuada do pH no microambiente dos poros de *scaffolds* (muitas vezes não captado por sensores que monitoram o pH do meio na saída do biorreator), cujo impacto é significativamente reduzido na cultura em perfusão, uma vez que os nutrientes são constantemente renovados e os metabólitos secundários removidos. Portanto, o

uso do pH como critério de avaliação do ambiente pela célula seria mais adequado que a concentração crítica de lactato - proposto no modelo baseado em agentes de Bayrak e colaboradores (2015) – além de ser um parâmetro cuja faixa de referência possui pouca variação para um amplo espectro de linhagens celulares.

Para a concentração de CO<sub>2</sub> de 5% (ou 1,2 mM) e o meio de cultura DMEM utilizados pelos autores (LOVECCHIO *et al.*, 2019), cuja concentração de bicarbonato de sódio (NaHCO<sub>3</sub>) é 44 mM (THERMOFISHER SCIENTIFIC, 2021b), considerando um pH inicial de tampão (pH ajustado com HCl) de 7,4 (parâmetro controlado nos experimentos descritos pelos autores), a capacidade tamponante desse sistema é de 49,1 mM pH<sup>-1</sup>, a partir da qual pode-se calcular a alteração de pH ( $\Delta pH$ ) do microambiente como (MICHL; PARK; SWIETACH, 2019):

$$\Delta pH = \frac{\text{ácido láctico produzido}}{\text{capacidade tamponante}} \quad (18)$$

Sendo a concentração de ácido láctico/lactato produzido (mM) determinada pela avaliação da vizinhança de Moore da célula (utilizando o fator de redução de 10<sup>10</sup>), o pH do microambiente a célula pode ser calculado como:

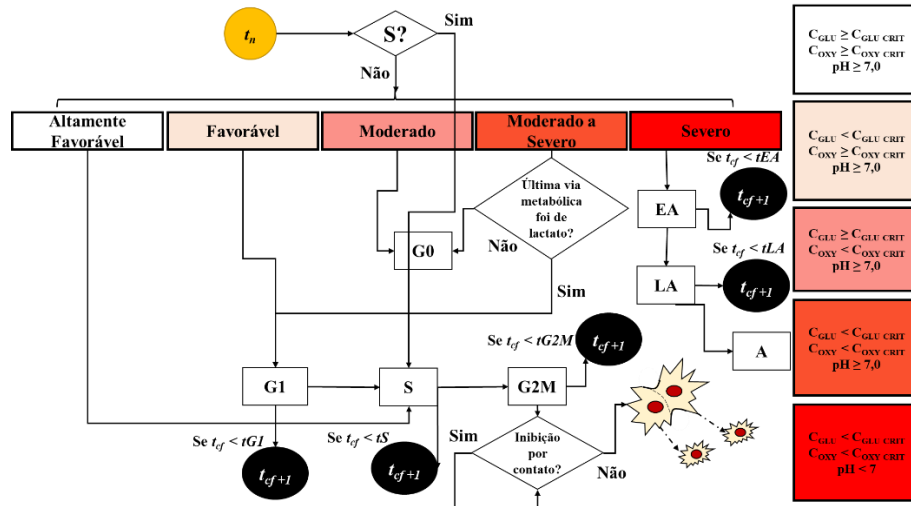
$$pH = 7,4 - \frac{[\text{ácido láctico}]}{49,1} \quad (19)$$

Portanto, as regras de avaliação do ambiente e resposta a suas condições podem ser descritas como na Figura 25.

Um rápido cálculo pode ser feito para demonstrar como a utilização da concentração limite de lactato como critério de decisão da favorabilidade do microambiente, proposto por Bayrak e colaboradores (2015), pode ser inadequado para muitas linhagens celulares, tanto por considerar esse metabólito como um produto secundário tóxico (BAYRAK *et al.*, 2015), quanto por desconsiderar o efeito tamponante do sistema CO<sub>2</sub>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Considerando o volume de 1 voxel ( $d = 20 \mu\text{m}$ ), o peso molecular do lactato como 89,07 g/mol (CID 91435) e o fator de redução de agentes do tipo molécula de 10<sup>10</sup>, o número de moléculas (*in silico*) de lactato, em um voxel onde a célula se encontra, necessário para se atingir a concentração limite de lactato é:

$$3 \frac{g}{L} \cdot \frac{mol}{89,07g} \cdot \frac{6,022 \times 10^{23} moléculas}{mol} \cdot \frac{1}{10^{10}} \cdot (20 \mu m)^3 \cdot \frac{10^{-15} L}{1 \mu m^3} = 16,22 \sim 17 \text{ moléculas}$$

Figura 25 - Regra de decisão de avaliação e resposta ao ambiente considerando o pH



Fonte: Willer Ferreira da Silva Junior, 2021.

Um rápido cálculo pode ser feito para demonstrar como a utilização da concentração limite de lactato como critério de decisão da favorabilidade do microambiente, proposto por Bayrak e colaboradores (2015), pode ser inadequado para muitas linhagens celulares, tanto por considerar esse metabólito como um produto secundário tóxico (BAYRAK *et al.*, 2015), quanto por desconsiderar o efeito tamponante do sistema  $CO_2/HCO_3^-$ . Considerando o volume de 1 voxel ( $d = 20 \mu m$ ), o peso molecular do lactato como 89,07 g/mol (CID 91435) e o fator de redução de agentes do tipo molécula de  $10^{10}$ , o número de moléculas (*in silico*) de lactato, em um voxel onde a célula se encontra, necessário para se atingir a concentração limite de lactato é:

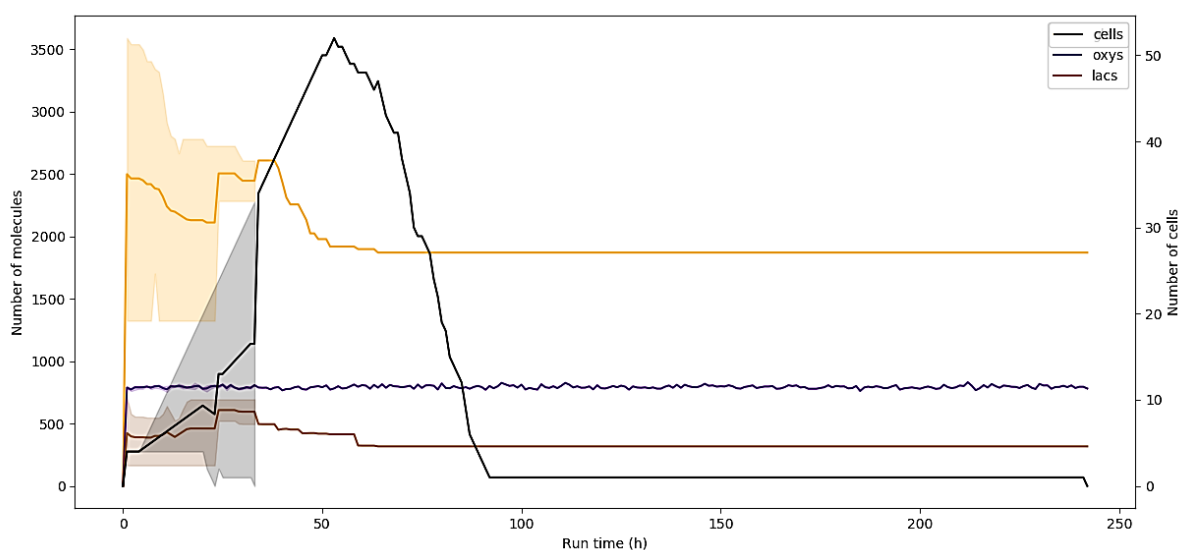
$$3 \frac{g}{L} \cdot \frac{mol}{89,07g} \cdot \frac{6,022 \times 10^{23} moléculas}{mol} \cdot \frac{1}{10^{10}} \cdot (20 \mu m)^3 \cdot \frac{10^{-15} L}{1 \mu m^3} = 16,22 \sim 17 \text{ moléculas}$$

Por outro lado, quando se utiliza a redução do pH (efeito da produção de ácido láctico/lactato) como critério de decisão da avaliação das condições do microambiente, o número de moléculas (*in silico*) de ácido láctico/lactato, em um voxel onde a célula se encontra, necessário para se atingir o pH limite (7,0) é:

$$-49,1 \frac{\text{mmol}}{\text{pH.L}} * (7,0 - 7,4)\text{pH} \cdot 10^{-3} \frac{\text{mol}}{1\text{mmol}} \cdot \frac{6,022 \times 10^{23} \text{moléculas}}{1\text{mol}} \cdot \frac{1}{10^{10}} \cdot (20 \mu\text{m})^3 \cdot \frac{10^{-15}\text{L}}{1\mu\text{m}^3} \sim 10 \text{ moléculas}$$

A Figura 26 mostra a resposta do modelo ao monitoramento do pH na simulação do cultivo de hBMSCs em modo estático, onde é possível verificar claras diferenças quando comparado ao cultivo no modo estático que utiliza a concentração de lactato como critério de decisão (Figura 24). Dentre essas diferenças, notam-se: extensão do cultivo (com células viáveis) por mais de 7 dias, maior pico de concentração celular, oscilações de produção e consumo de lactato. Portanto, esse resultado se aproxima mais do perfil de crescimento celular no modo estático em *scaffold* em experimentos *in vitro*, como o conduzido por Lovecchio e colaboradores (2019).

Figura 26 – Cinética do cultivo celular no modo estático utilizando o pH como critério de decisão da regra de avaliação do ambiente



Fonte: Willer Ferreira da Silva Junior, 2021. No gráfico, glcs (--) significa número de moléculas de glicose, oxys (--) significa número de moléculas de oxigênio, lacs (--) significa número de moléculas de lactato e cells (--) significa número de células. O cultivo foi simulado com *scaffold* de porosidade 0,764.

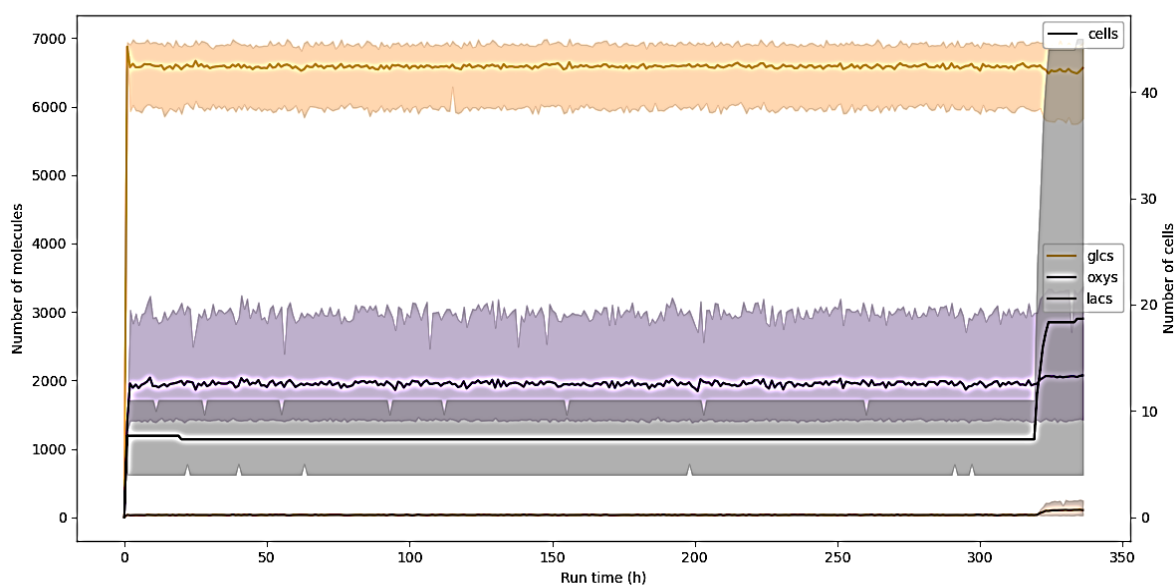
O pH extracelular possui um importante papel no desenvolvimento das células, uma vez que ele afeta diretamente a carga de glicoproteínas e proteínas de membrana, assim como pode contribuir para a desestabilização da membrana lipídica das células e alterar a conformação nativa de proteínas de membrana que possuem interface direta com o meio extracelular (tais como integrinas) (RINGER *et al.*, 2017; MACKENZIE; MACKENZIE; BECK, 1961; ANGELOVA; PUFF, 2018). Além disso, variações no pH extracelular podem promover alterações no pH citoplasmático, o que resulta em interferências diretas em diversos

mecanismos de sinalização da proliferação celular – ativação de transportadores de  $\text{Ca}^+$ , tais como NHE1, e ERK1 -, função de ciclinas e proteínas quinases – Ciclina B1 e NHE1- e enzimas que regulam o metabolismo celular – como a fosfofrutoquinase-1 (FLINCK; KRAMER; PEDERSEN, 2018).

Recentemente, vários autores têm demonstrado a efetividade do controle de pH na obtenção de culturas de células de alta densidade e maiores produções de biomoléculas de interesse, tanto por meio do controle de parâmetros de processo – tais como  $\text{pCO}_2$  e adição de ácido/base (BECKER *et al.*, 2019; BRUNNER *et al.*, 2017) -, quanto pela adição de reguladores de enzimas do catabolismo da glicose (BUCHSTEINER *et al.*, 2018) e seleção/adaptação de linhagens celulares crescidas em meios suplementados com lactato (FREUND; CROUGHAN, 2018). Esses resultados corroboram que o fator de depleção do cultivo celular é o pH, o qual é consequência da produção de lactato, o que justifica o uso desse parâmetro como fator decisório da favorabilidade do microambiente o desenvolvimento das células.

Por outro lado, pode-se inferir que a alternância entre a concentração limite de lactato e o pH como critérios decisórios tenha pouco ou nenhum impacto nas simulações em cultivo em perfusão, uma vez que os metabólitos são continuamente removidos pelo fluxo ascendente do meio de cultura (mimetizado no modelo pela função de deslocamento das moléculas). De fato, percebe-se pela Figura 27 que o número de moléculas de lactato foi mantido a níveis basais durante todo o cultivo.

Figura 27 - Cinética do cultivo celular no modo perfusão



Fonte: Willer Ferreira da Silva Junior, 2021. No gráfico, glcs (--) significa número de moléculas de glicose, oxys (--) significa número de moléculas de oxigênio, lacs (--) significa número de moléculas de lactato e cells (--) significa número de células.

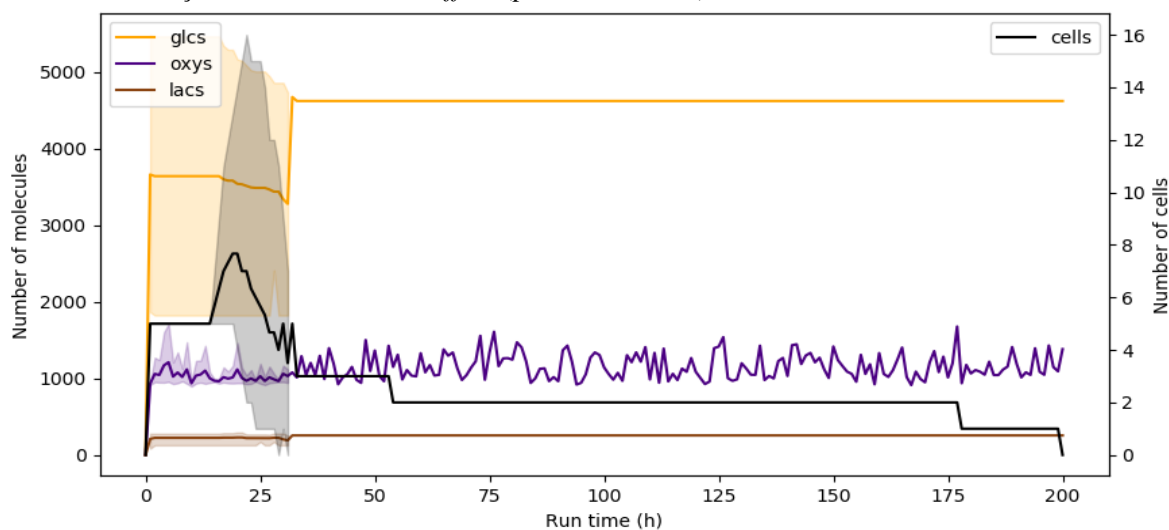


Outro importante ponto a ser destacado é a importância da consideração das interações moléculas – *scaffold* – células. O deslocamento de moléculas em superfícies porosas possui contribuição de componentes difusivos e convectivos, os quais terão mais contribuição no deslocamento de moléculas dependendo da escolha do tipo de cultivo (perfusão ou estático). A estrutura do *scaffold*, ao mesmo tempo que promove a adesão celular, confere resistência ao deslocamento de células e moléculas, dificultando a remoção de metabólitos secundário e reposição de nutrientes, especialmente no cultivo em modo estático, onde o componente convectivo do deslocamento das moléculas é ausente. A Figura 28 evidencia a mudança do perfil de consumo de nutrientes e formação de lactato na ausência de *scaffold*, indicando a importância de se considerar o efeito de microambiente na modelagem e simulação de cultura de tecidos em *scaffolds*.

Esse tipo de interação molécula – *scaffold* – célula, bem como outras características constituintes da complexidade da engenharia de tecidos têm sido comumente omitidas ou desconsideradas nos modelos baseados em agentes ou autômatos celulares desenvolvidos para simulação de cultura de células/tecidos. Por exemplo, embora o modelo de Cheng e co-autores (2006) apresente vantagens sobre o de Chung e colaboradores (2010) por considerar um sistema tridimensional na avaliação do papel do deslocamento e colisão na proliferação celular, a presunção de ausência de apoptose e deslocamento irrestrito ao longo do volume definido é prejudicial ao modelo, uma vez que ambos os fatores podem alterar grandemente a proliferação e deslocamento celular, respectivamente, como apresentado nos resultados do presente trabalho.

Ainda que o modelo de Chung e colaboradores (2010) seja em 2D, este possui regras de comportamento mais complexas por considerar o efeito do gradiente de nutrientes no deslocamento e proliferação celular. Galbusera e colaboradores (2007) desenvolveram um modelo de autômatos celulares baseado no trabalho de Cheng e co-autores (2006). Em seu estudo, as células permanecem em deslocamento em uma determinada direção até atingir o tempo de recorrência (caminhada aleatória), ou até sofrer colisão com outra célula ou parede da estrutura 3D (*scaffold* de poros esferoidais). As células também sofrem divisão celular e a concentração de oxigênio é calculada em cada autômato de acordo com o balanço de massa para o nutriente e o modelo de Michaelis-Menten para taxa de consumo de oxigênio em um regime de cultivo em perfusão.

Figura 28 - Cinética do cultivo celular no modo estático utilizando o pH como critério de decisão da regra de avaliação do ambiente sem *scaffold* (porosidade 100%).



Fonte: Willer Ferreira da Silva Junior, 2021. No gráfico, glcs (--) significa número de moléculas de glicose, oxys (--) significa número de moléculas de oxigênio, lacs (--) significa número de moléculas de lactato e cells (--) significa número de células.

Este modelo baseado em autômatos celulares (CHENG *et al.*, 2006) reúne importantes características da dinâmica celular, tais como consumo de nutriente, deslocamento, colisão com células e *scaffold*, e o negligenciamento da morte celular é aceitável na condição de cultivo por perfusão (processo contínuo) em modelos de campo médio, uma vez que a população pode ser mantida em escala lag de crescimento nesta condição (taxa de mortalidade muito menor que a de crescimento). Entretanto, pode ser observado que um gradiente de concentração de oxigênio é formado ao longo do *scaffold*, havendo formação de agregados de células em uma zona de hipóxia, o que não deveria ocorrer caso regras de apoptose celular tivessem sido consideradas.

O modelo de Egan, Shea e Ferguson (2018) mimetizou o crescimento celular mediado pela curvatura do *scaffold* para avaliar o efeito de suas propriedades física, mecânica e reológicas, mas desconsidera todos os comportamentos celulares. Germann, Marin-Riera e Sharpe (2019) desenvolveram o modelo baseado em agentes ya||a para estudo de morfogênese em células epiteliais e mesenquimais utilizando o modelo de esferoides com a adição *spins*/setas para simular camadas epiteliais e polaridade tecidual. O modelo também simula comunicações parácrinas e por contato, ligação preferencial por tipo de célula e migração celular por inércia ou fricção local; embora o modelo tenha se mostrado capaz de gerar padrões de polarização no sistema, o ciclo celular, metabolismo celular e interação com o meio foram completamente desconsiderados.

Embora muitos trabalhos descrevam o movimento de células como caminhadas aleatórias (CHUNG, LIN, CHEN E HUANG, 2010; CHARLEBOIS, BALÁZSI, 2019) é

sabido que o deslocamento das células é impulsionado por fatores do seu micro ecossistema e do tipo de diferenciação da célula, tais como tensão e rigidez da matriz extracelular – durotaxis (TORII, VELLIU, HODGSON, MUDERA, 2018; GONZÁLEZ-VALVERDE, GARCÍA-AZNAR, 2018), forças repulsivas, de adesão, e quimiotaxia, inclusive causada por fatores de crescimento (CYTOWSKI *et al.*, 2017; CHENG, YOUSSEF, MARKENSCOFF, ZYGOURAKIS, 2006).

Torii e colaboradores (2018) também avaliaram isoladamente o deslocamento de células por durotaxis e tensão aplicada por elas (agentes) sobre a malha representativa da matrix de hidrogel de colágeno do modelo experimental, desconsiderando os demais comportamentos celulares. Sun e co-autores (2008) utilizaram a plataforma FLAME para modelagem de uma cultura mista de queratinócitos e fibroblastos (agentes) em uma placa plana de 500 x 500  $\mu\text{m}$  utilizando modelo de esferas não deformáveis.

Os agentes enviam suas informações individuais de posição e tipo de célula (células-tronco, células de amplificação em trânsito (TA), células comprometidas, corneócitos, fibroblastos dérmicos humanos proliferativos ou diferenciados) para uma lista/banco de dados global; fibroblastos e células TA se deslocam a 1  $\mu\text{m}$  /min, enquanto as demais células se movimentam passivamente, sendo que o contato entre fibroblasto e queratinócito proliferativos estimulam o ciclo celular e o contato de células diferenciadas com proliferativas estimulam a sua diferenciação (SUN *et al.*, 2008).

Este modelo baseado em agentes também levou em consideração a interação de células com a matriz extracelular, o estímulo de fatores solúveis de soro na cultura e a apoptose celular. Resultados obtidos pelos autores se assemelham aos resultados experimentais, reproduzindo comportamentos da cultura mista *in vitro* em 2D, considerando a quantidade de nutrientes na placa abundante (SUN *et al.*, 2008). O resultado desse trabalho demonstra a importância de se considerar comportamentos celulares fundamentais das células para se obter resultados de fenômenos emergentes de relevância prática dos sistemas biológicos.

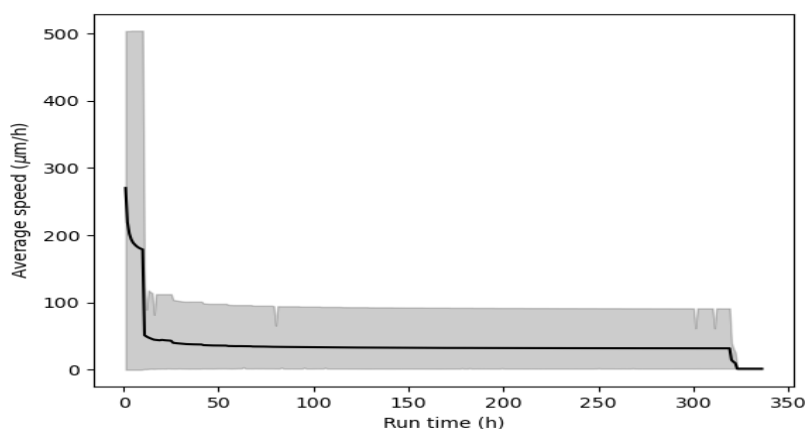
A Figura 29 retrata um indicador importante da cultura de células que reflete indiretamente a interação célula – *scaffold* e a sinalização celular por meio da avaliação quimiotóxica de fatores de crescimento no microambiente das células. Este indicador descrito por Chung *et al.* (2010), Cheng e colaboradores (2006) e Zhang e co-autores (2016) como um dos fatores primordiais para se atingir alta taxa de ocupação do espaço de cultivo: a velocidade de deslocamento das células. Esta medida está relacionada ao deslocamento das células, o qual corrobora com a formação de colônias e ocupação da superfície de cultivo.

A velocidade média de deslocamento das células tende a diminuir com o aumento da densidade celular/taxa de ocupação do espaço, devido às colisões célula-célula e célula-superfície, além da aderência às moléculas de adesão das células e MEC (CHUNG *et al.*, 2010). Na Figura 29, observa-se esse mesmo comportamento na simulação das condições de cultivo de hBMSCs em *scaffold* no modo perfusão. As células se deslocam pelos poros vazios no início do cultivo, por quimiotaxia (o movimento ascendente dos fatores de crescimento estimulam a migração celular) ou caminha aleatória, até se aderirem à matriz extracelular (mimetizada no modelo pelos voxels de valor igual a 2, atribuído por células produtoras de MEC), iniciarem o processo de mitose ou sofrerem inibição por contato. Esses últimos fenômenos ocorrem em maior intensidade nas últimas horas da simulação, onde se observam uma queda acentuada da velocidade média das células (Figura 29), concomitante à proliferação celular (Figura 27).

Tais resultados também evidenciam os significativos incrementos de regras comportamentais das células (interação com *scaffold*, morte celular, avaliação do microambiente e metabolismo celular) em comparação com modelos baseados em agentes ou autômatos celulares descritos na literatura (CHENG *et al.*, 2006; GALBUSERA *et al.*, 2007; CHUNG *et al.*, 2010), onde tais regras são desconsideradas.

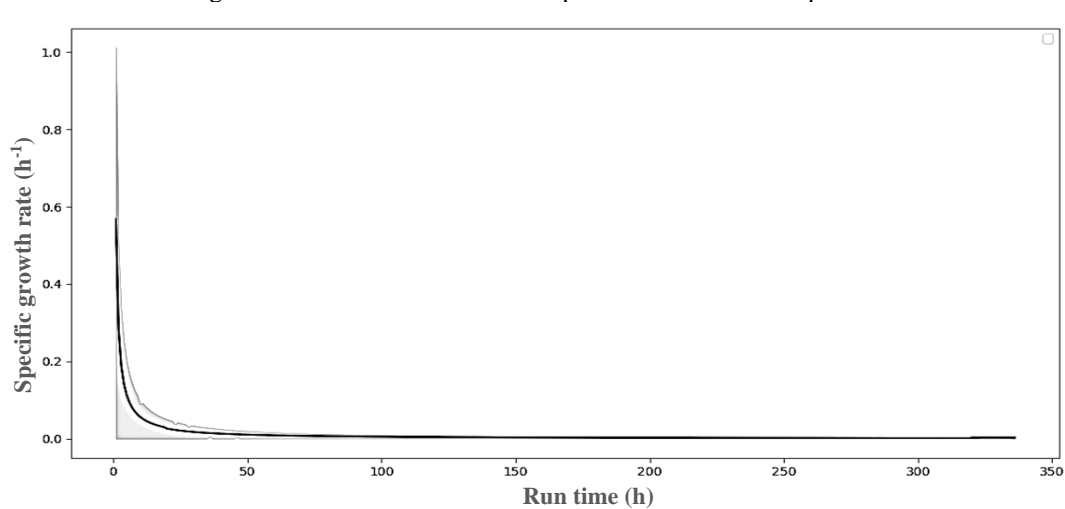
Outro parâmetro que comprova a pertinência do modelo baseado em agentes desenvolvido na simulação de cultivo de células em *scaffold* para desenvolvimento de tecido é apresentado na Figura 30.

Figura 29 – Velocidade média de deslocamento das células ao longo da simulação



Fonte: Willer Ferreira da Silva Junior, 2021.

Figura 30 - Taxa de crescimento específico no cultivo em perfusão



Fonte: Willer Ferreira da Silva Junior, 2021.

A taxa de crescimento específico é um indicador de desempenho de cultura de células e tecidos, o qual indica a velocidade de crescimento da população celular. Em cultivos em perfusão, após um período de crescimento exponencial nos primeiros períodos (horas ou dias, a depender do tempo de duplicação celular da linhagem utilizada) do processo, a taxa de crescimento específico reduz gradualmente e se mantém constante, próximo a zero, ao longo do processo (YAMAJI; FUKUDA; 1994). Esse comportamento pode ser observado na Figura 30, o que demonstra que o presente modelo baseado em agentes reproduz o comportamento de cultura de tecidos e células animais em perfusão.

De fato, o perfil do gráfico acima se assemelha àqueles reportados nos trabalhos de Yamaji e Fukuda (1994), onde os autores estudaram a cinética de crescimento de células de mieloma de camundongos MPC-11 (ATCC CCL 167) imobilizados em resina reticulada de polivinil formal de porosidade igual a 0,88 e tamanho de poro médio de 60  $\mu\text{m}$ . Kwon, e colaboradores (2017), conseguiram manter a taxa de crescimento específico de CHO em cultivo em perfusão em  $0,03 \text{ h}^{-1}$ , valor este aproximadamente igual ao obtido durante a fase de crescimento exponencial das células em um reator em batelada.

O programa desenvolvido também proporciona a visualização da interação dos agentes em tempo real. Essa funcionalidade é especialmente interessante para possibilitar avaliar de modo rápido, a resposta dos agentes condicionadas às regras estabelecidas. Na Figura 31, por exemplo, é possível ver a disposição dos agentes no início (Figura 31 a) e após 24 interações (Figura 31 b) da simulação, a qual evidencia que as moléculas de oxigênio e glicose iniciam a movimentação da base do scaffold em um movimento ascendente.

Além disso, o presente modelo baseado em agentes foi efetivo na criação de *scaffolds* com dimensões e tamanho de poros variáveis e porosidade controlada, mantendo as relações de escala espacial entre o *scaffold* e as células, permitindo a movimentação de moléculas e células através dos macroporos, conforme observado nos resultados das propriedades do *scaffold* e simulações do cultivo. O *scaffold* gerado possui estrutura e método de construção similar à obtida na modelagem do arcabouço pela equação de reação-difusão de Schnakenberg empregada por Velasco, Lancheros e Garzón-alvarado (2016).

As regras implementadas funcionaram de acordo com o que foi programado – baseado em dados de experimentos *in vitro* e *in vivo* descritos na literatura -, possibilitando a visualização do sistema 3D em movimento em tempo real e a avaliação gráfica dos resultados obtidos. Além disso, a representação de moléculas como agentes que se deslocam pelos poros, condicionadas por fatores determinísticos (p. ex., movimento ascendentes em cultivo de perfusão) e aleatórios (p. ex., movimento randômico/browniano no plano xy) possibilitou a visualização do efeito do microambiente no desenvolvimento de tecidos em *scaffolds*, reproduzindo a obtenção e consumo de energia pelas vias glicolítica (aeróbia e anaeróbia), fosforilação oxidativa e catabolismo de lactato, bem como seus impactos no ciclo celular.

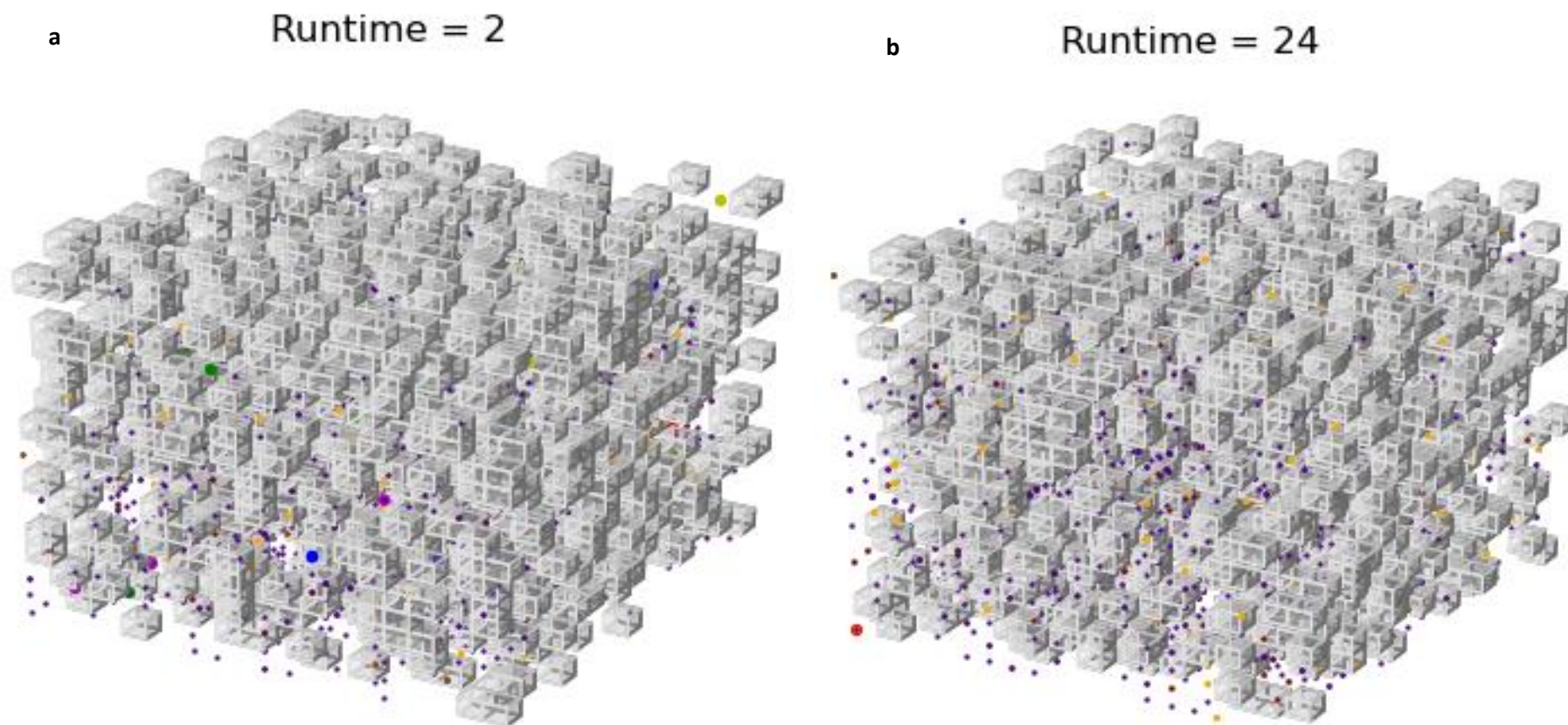
No entanto, otimizações no código do programa são necessárias a fim de reduzir o esforço computacional, possibilitando a ampliação do espaço de desenho – ou faixas operacionais das variáveis de entrada – do programa, especialmente no que tange às concentrações de moléculas. Em conjunto do uso de computadores mais eficientes e com maior capacidade de processamento de dados, recomenda-se a execução das simulações nas condições descritas no planejamento experimental para possibilitar a análise dos componentes principais do modelo. Além disso, a aplicação de simulação de Monte Carlo para avaliação da sensibilidade do modelo aos parâmetros fixos (obtidos de bancos de dados e resultados de experimentos obtidos na literatura especializada), bem como para determinar a complexidade total do sistema, é de grande valia para compreender o impacto de tais parâmetros na resposta do modelo.

Ainda nesse contexto, a criação de um módulo (banco de dados interno) de parâmetros celulares para diferentes linhagens celulares, além de facilitar o uso do programa para simulações de tecidos específicos, pode aumentar a exatidão do modelo. O uso de ferramentas GUI (*Graphical User Interface* – Interface gráfica para usuário) torna-se também necessária para viabilizar o uso do programa por pesquisadores e docentes de diferentes áreas como plataforma de experimentação *in silico* de cultura de tecidos cartilaginoso e ósseo, como é o

caso dos programas FLAME, Cell Studio, LINDSAY, CellSys e CompuCell3D (LIBERMAN *et al.*, 2018).

A implementação de algoritmos ou integração com pacotes de processamento de dados de imagens de tecidos humanos ou de *scaffolds* naturais - tais como Quantifima (SHKARIN *et al.*, 2019) - para reprodução dessas estruturas no presente modelo baseado em agentes, pode também aumentar a exatidão do modelo desenvolvido neste trabalho, ao proporcionar estruturas de *scaffold* mais próximas das encontradas *in vivo*. De forma complementar, o desenvolvimento de códigos que mimetizem a transdução de forças/estímulos aplicados ao *scaffold* em sinais mecânicos/químicos e regras de comportamento celular que respondam às tensões das superfícies das matrizes podem ser importantes no entendimento de fenômenos emergentes de diferenciação celular (não abordado no presente trabalho).

Figura 31 – Vista frontal superior dos agentes interagindo entre si e com a estrutura do *scaffold* durante períodos diferentes da simulação



Fonte: Willer Ferreira da Silva Junior, 2021. Os cubos vazados representam os espaços ocupados pela massa dos polímeros do *scaffold*; as bolhas representam as células, sendo que suas cores representam os seus estágios do ciclo celular; as moléculas de glicose são representadas por um pentágono laranja, as moléculas de oxigênio são representadas por pontos roxos e as de lactato, pelo símbolo “tri\_left” de cor marrom. Os agentes se deslocam em um espaço finito, limitado às dimensões  $x_{max}$ ,  $y_{max}$  e  $z_{max}$ . Caso as moléculas atinjam o topo do *scaffold* ( $z_{max}$ ), a molécula é removida da lista de agentes.



## 6 CONCLUSÃO

Por meio do algoritmo desenvolvido para o modelo baseado em agentes descrito neste trabalho, foi possível simular comportamentos celulares de deslocamento, inibição por contato, interação com MEC, divisão celular, apoptose, quimiotaxia, metabolismo de carboidratos, bem como a movimentação de moléculas ao longo de um *scaffold* tridimensional com poros interconectados, gerado por distribuição aleatória de voxels vazios em uma estrutura hexaédrica 3D.

Os resultados apresentados mostram que a complexidade energética do sistema modelado (cultura de células 3D em *scaffold* poroso) é aumentada em condições de cultivo que proporcionam proliferação celular controlada.

Por fim, os resultados descritos neste trabalho também apontam para a possibilidade de uso do programa desenvolvido como plataforma de experimentação *in silico* de cultura de tecidos cartilaginoso e ósseo, na investigação preliminar de fenômenos biológicos ou de viabilidade de condições de cultivo de tecido alterando-se as variáveis do modelo (p. ex., variação da proporções de células produtoras/não produtoras de MEC).

## REFERÊNCIAS<sup>1</sup>

- AHMED, S., CHAUHAN, V. M., GHAEMMAGHAMI, A. M., AYLOTT, J. W. New generation of bioreactors that advance extracellular matrix modelling and tissue engineering. **Biotechnology Letters**, v. 41, p.1–25, 2019.
- AL-ANI, A., TOMS, D., KONDRO, D., THUNDATHIL, J., YU, Y., UNGRIN, M., IVANOVIC, Z. Oxygenation in cell culture: Critical parameters for reproducibility are routinely not reported. **PLoS One**, v. 13, n. 10, p. 1 – 13, 2018.
- ALIANCE FOR REGENERATIVE MEDICINE. **Available Products**. Disponível em: < <https://alliancerm.org/available-products/> >. Acesso em: 25 de novembro de 2019.
- ALMEIDA, H. A., BÁRTOLO, P. J. Design of tissue engineering scaffolds based on hyperbolic surfaces: Structural numerical evaluation. **Medical Engineering & Physics**, v. 36, p. 1033–1040, 2014.
- ANGELOVA, M. I., PUFF, N. pH sensing by lipids in membrane: The fundamentals of pH-driven migration, polarization and deformations of lipid bilayer assemblies. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes**, v. 1860, n. 10, p. 2042 – 2063, 2018.
- ANTONIADES, H. N. Human platelet-derived growth factor (PDGF): purification of PDGF-I and PDGF-II and separation of their reduced subunits. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v. 78, n. 12, p. 7314 – 7317, 1981.
- AZIZA, R., BORGI, A., ZGAYA, H., GUINHOUYA, B. Simulating Complex Systems Complex System Theories, their Behavioural Characteristics and their Simulation. 8th International Conference on Agents and Artificial Intelligence, Rome:Italy, 2016, p. 1 – 13.
- BAKER, B. M, CHEN, C. S. Deconstructing the third dimension: how 3D culture microenvironments alter cellular cues. **J Cell Sci.**, v. 125, n. 13, p. 3015 – 3024, 2012.
- BARTIS, D., PONGRACZ, J. Three-dimensional tissue cultures and tissue engineering. Pécs: University of Pécs, 2011.
- BATTY, M., TORRENS, P. M. Modelling complexity: The limits to prediction. Cybergeog. **European Journal of Geography**, v. 2001, n. 201, 2001.
- BAYRAK, E. S., WANG, T., CINAR, A., UNDEY, C. Computational Modeling of Fed-Batch Cell Culture Bioreactor: Hybrid Agent-Based Approach. **IFAC-PapersOnLine**, v. 48, n. 8, p.1252–1257, 2015.
- BECKER, M, JUNGHANS, L., TELEKI, A., BECHMANN, J., TAKORS, R. The less the better: how suppressed base addition boosts productions of monoclonal antibodies with Chinese Hamster Ovary cells. **Front. Bioeng. Biotechnol.**, v. 7, n. 76, p. 1 – 12, 2019.
- BEQUETTE, B. W. Process dynamics: modeling, analysis and simulation. New Jersey: Prentice-Hall, 1998.
- BIONUMBERS. Diameter of NIH/3T3 embryonic fibroblast cell. Disponível em: < <https://bionumbers.hms.harvard.edu/bionumber.aspx?id=108905&ver=1&trm=fibroblast&org=> >. Acesso em: 13 de outubro de 2020.
- BIOPHARMGUY. 35 Tissue Engineering Companies – Worldwide. Disponível em: < <https://biopharmguy.com/links/company-by-location-tissue-engineering.php> >. Acesso em: 06 de junho de 2020.
- BREGENZER, M. E., HORST, E. N., MEHTA, P., NOVAK, C. M., RAGHAVANID, S., SNYDERID, C. S., MEHTA, G. Integrated cancer tissue engineering models for precision medicine. **PLoS ONE**, v. 14, n. 5, 1 – 40, 2019.

<sup>1</sup> De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 6023 (2002).

BRITISH SOCIETY FOR CELL BIOLOGY. Cell Signalling – Interim note. Disponível em: < <https://bscb.org/learning-resources/softcell-e-learning/cell-signalling-interim-note/>>. Acesso em: 10 de fevereiro de 2021.

BRUNNER, M., FRICKE, J., KROLL, P., HERWING, C. Investigation of the interactions of critical scale-up parameters (pH, pO<sub>2</sub> and pCO<sub>2</sub>) on CHO batch performance and critical quality attributes. **Bioprocess and Biosystem Engineering**, v. 40, n. 2, p. 251 – 263, 2017.

BUCHSTEINER, M., QUEK, L. E., GRAY, P., NIELSEN, L. K. Improving culture performance and antibody production in CHO cell culture processes by reducing the Warburg effect. **Biotechnology and bioengineering**, v. 115, n. 9, p. 2315 – 2327, 2018.

BUROVA, I., WALL, I., SHIPLEY, R. J. Mathematical and computational models for bone tissue engineering in bioreactor systems. **Journal of Tissue Engineering**, v. 10, p. 1–25, 2019.

CATT, C., SCHUURMAN, W., SENGERS, B. G., VAN WEEREN, P. R. DHERT, W. J. A., PLEASE, C. P., MALDA, J. Mathematical modelling of tissue formation in chondrocyte filter cultures. **European Cells and Materials**, v. 22, p. 377-392, 2011.

CELL SYSTEMS. Medium Formulated at Normal Blood Glucose Level (0.9008g/L) without Serum and with CultureBoost™ (4N3-500). Disponível em: < <https://cell-systems.com/products/complete-medium-kit-formulated-at-normal-blood-glucose-level-without-serum-and-without-cultureboost-4n3-500-s>>. Acesso em: 15 de julho de 2021.

CHAN, B. P., LEONG, K. W. Scaffolding in tissue engineering: general approaches and tissue-specific considerations. **Eur Spine J.**, v. 17, n. 4, p. 467–479, 2008.

CHANTRE, C. O., GONZALEZ, G. M., AHN, S., CERA, L., CAMPBELL, P. H., HOERSTRUP, S. P., PARKER, K. K. Porous Biomimetic Hyaluronic Acid and Extracellular Matrix Protein Nanofiber Scaffolds for Accelerated Cutaneous Tissue Repair. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 11, n. 49, p. 45498 – 45510, 2019.

CHARLEBOIS, D. A., BALÁZSÍ, G. Modeling cell population dynamics. **In Silico Biology**, n. 13, p. 21–39, 2019.

CHANES-CUEVAS, O. A., PEREZ-SORIA, A., CRUZ-MAYA, I., GUARINO, V., ALVAREZ-PEREZ, M. A. Macro-, micro- and mesoporous materials for tissue engineering applications. **AIMS Materials Science**, v. 5, n. 6, p. 1124 – 1140, 2018.

CHENG, G., YOUSSEF, B. B., MARKENSCOFF, P., ZYGOURAKIS, K. Cell Population Dynamics Modulate the Rates of Tissue Growth Processes. **Biophysical Journal**, v. 90, p.713–724, 2006.

CHUAN, Y. L., HOQUE, M. D. E., PASHBY, I. Prediction of Patient-Specific Tissue Engineering Scaffolds for Optimal Design. **International Journal of Modeling and Optimization**, v. 3, n. 5, p. 468 – 470, 2013.

CHUNG, C. A., LIN, T., CHEN, S., HUANG, H. Hybrid cellular automaton modeling of nutrient modulated cell growth in tissue engineering constructs. **Journal of Theoretical Biology**, v. 262, p. 267 – 278, 2010.

CLARK, J. B., JACQUES, D. R. Practical measurement of complexity in dynamic systems. **Procedia Computer Science**, v. 8, p. 14 – 21, 2012.

CONNOR, Y., TEKLEAB, Y., TEKLEAB, S., NANDAKUMAR, S., BHARAT, D., SENGUPTA, S. A mathematical model of tumorendothelial interactions in a 3D coculture. **Nature Scientific Reports**, v. 9, n. 8429, p. 1 – 14, 2019.

CYTOWSKI, M., SZYMANSKA, Z., UMINSKI, P., ANDREJCZUK, G., RASZKOWSKI, K. Implementation of an Agent-Based Parallel Tissue Modelling Framework for the Intel MIC Architecture. **Hindawi Scientific Programming**, v. 2017, p. 1-11, 2017.

D'AIUTO, L., NACIRI, J., RADIO, N., TEKUR, S., CLAYTON, D., APODACA, G., DI MAIO, R., ZHI, Y., DIMITRION, P., PIAZZA, P., DEMERS, M., WOOD, J., CHU, C., CALLIO, J., MCCLAIN, L., YOLKEN, R., MCNULTY, J., KINCHINGTON, P., BLOOM, D., NIMGAONKAR, V. Generation of three-dimensional human neuronal cultures: application to modeling CNS viral infections. **Stem Cell Res Ther.**, v. 9, n. 134, p. 1-9, 2018.

DINESCU, S., IONITA, M., IGNAT, S., COSTACHE, M., HERMENEAN, A. Graphene Oxide Enhances Chitosan-Based 3D Scaffold Properties for Bone Tissue Engineering. **Int J Mol Sci.**, v. 20, n. 5077, p. 1 – 22, 2019.

DINIS, J. C., MORAIS, T. F., AMORIM, P. H. J., RUBEN, R. B., ALMEIDA, H. A., INFORÇATI, P. N., BÁRTOLO, P. J., SILVA, J. V. L. Open-Source Software for the Automatic Design of Scaffold Structures for Tissue Engineering Applications. **Procedia Technology**, v. 16, p. 1542 – 1547, 2014.

DONATIS, A. COMITO, G., BURICCHI, F., MANAO, G., RAMPONI, G., CIRRI, P. Proliferation Versus Migration in Platelet-derived Growth Factor Signaling. **MECHANISMS OF SIGNAL TRANSDUCTION**, v. 283, n. 29, p. 19948 - 19956, 2008.

DUVAL, K., GROVER, H., HAN, L., MOU, Y., PEGORARO, A. F., FREDBERG, J., CHEN, Z. Modeling Physiological Events in 2D vs. 3D Cell Culture. **Physiology**, v. 32, p. 266 –277, 2017.

EGAN, P. F., SHEA, K. A., FERGUSON, S. J. Simulated tissue growth for 3D printed scaffolds. **Biomechanics and Modeling in Mechanobiology**, p. 1 – 15, 2018.

EGAN, P. F., GONELLA, V. C., ENGENSERGER, M., FERGUSON, S. J., SHEA, K. Computationally designed lattices with tuned properties for tissue engineering using 3D printing. **PLoS ONE**, v. 12, n. 8, p. 1 – 13, 2017.

FREUND, N. W., CROUGHAN, M. S. A Simple Method to Reduce both Lactic Acid and Ammonium Production in Industrial Animal Cell Culture. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 19, n. 385, p. 1 – 22, 2018.

FERGUSON, B. S., ROGATZKI, M. J., GOODWIN, M. L., KANE, D. A., RIGHTMIRE, Z., GLADDEN, L. B. Lactate metabolism: historical context, prior misinterpretations, and current understanding. **European Journal of Applied Physiology**, v. 118, p. 691 – 728, 2018.

FLAMHOLZ, A., PHILLIPS, R., MILO, R. The quantified cell. **Mol Biol Cell.**, v. 25, n. 22, p. 3497 – 3500, 2014.

FISCHER, T., HAYN, A., MIERKE, C. T. Effect of Nuclear Stiffness on Cell Mechanics and Migration of Human Breast Cancer Cells. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 8, p. 1-18, 2020.

FISCHER, T., HAYN, A., MIERKE, C. T. Fast and reliable advanced two-step pore-size analysis of biomimetic 3D extracellular matrix scaffolds. **Scientific Reports**, v. 9, n. 8352, p. 1-10, 2019.

FLINCK, M., KRAMER, S. H., PEDERSEN, S. F. Roles of pH in control of cell proliferation. **Acta Physiologica**, v. 223, n. 3, p. 1 – 35, 2018.

FREITAS, D., ALMEIDA, H. A., BÁRTOLO, P. J. Perfusion bioreactor fluid flow optimization. **Procedia Technology**, v. 16, p. 1238 – 1247, 2014.

FRESHNEY, R. I. Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique. 6 ed. Hoboken, N.J.: Wiley-Liss, 2005.

GALBUSERA, F., CIOFFI, M., RAIMONDI, M. T., PIETRABISSA, R. Computational modeling of combined cell population dynamics and oxygen transport in engineered tissue subject to interstitial perfusion. **Computer Methods in Biomechanics and Biomedical Engineering**, v. 10, n. 4, p. 279 – 287, 2007.

GERMANN, P., MARIN-RIERA, M., SHARPE, J. GPU-powered Spheroid Models for Mesenchyme and Epithelium. **Cell Systems**, v. 8, n. 3, p. 261 - 266, 2019.

GHASSEMI, T., SHAHROODI, A., EBRAHIMZADEH, M. H., MOUSAVIAN, A., MOVAFFAGH, J., MORADI, A. Current Concepts in Scaffolding for Bone Tissue Engineering. **Arch Bone Jt Surg.**, v. 6, n. 2, p. 90 – 99, 2018.

- GIANNITELLI, S. M., ACCOTO, D., TROMBETTA, M., RAINER, A. Current trends in the design of scaffolds for computer-aided tissue engineering. **Acta Biomaterialia**, v. 10, n. 2, p. 580-594, 2014.
- GILBERT, E., MOSHER, M., GOTTIPATI, A., ELDER, S. A Novel Through-Thickness Perfusion Bioreactor for the Generation of Scaffold-Free Tissue Engineered Cartilage. **Processes**, v. 2, p. 658 – 674, 2014.
- GLEN, C. M., KEMP, M. L., VOIT, E. O. Agent-based modeling of morphogenetic systems: Advantages and challenges. **PLoS Comput Biol**, v. 3, n. 15, p. 1-31, 2019.
- GOMES, V. M., PAIVA, J. R. B., REIS, M. R. C., WAINER, G. A., CALIXTO, W. P. Mechanism for Measuring System Complexity Applying Sensitivity Analysis. **Hindawi Complexity**, v. 2019, n. 1303241, p. 1 – 12, 2019.
- GONZÁLEZ-VALVERDE, I., GARCÍA-AZNAR, J. M. Mechanical modeling of collective cell migration: An agent-based and continuum material approach. **Comput. Methods Appl. Mech. Engrg.**, v. 337, p. 246 – 262, 2018.
- GRIFFITH, L. G., NAUGHTON, G. Tissue Engineering—Current Challenges and Expanding Opportunities. **Science**, v. 295, p. 1009 - 1014, 2002.
- GUARINO, V., CAUSA, F., AMBROSIO, L. Porosity and mechanical properties relationship in PCL porous scaffolds. **Journal of Applied Biomaterials & Biomechanics**, v. 5, n. 3, p. 149-157, 2007.
- HOTALING, N. A., BHARTI, K., KRIEL, H., SIMON, C. G. DiameterJ: A Validated Open-Source Nanofiber Diameter Measurement Tool. **Biomaterials**, v. 61, p. 327–338, 2015.
- HANDORF, A. M., ZHOU, Y., HALANSKI, M. A., LI, W. Tissue Stiffness Dictates Development, Homeostasis, and Disease Progression. **Organogenesis**, v. 11, n. 1, p. 1 – 15, 2015.
- HARPER, J. V, BROOK, G. The Mammalian Cell Cycle: An Overview. In: HUMPHREY, T., GAVIN, B. (Eds.) *Cell Cycle Control: Mechanisms and Protocols*. Totowa, NJ: Humana Press Inc., 2005, p. 112.
- IATRIDIS, J. C., WU, J., YANDOW, J. A., LANGEVIN, H. M. Subcutaneous Tissue Mechanical Behavior is Linear and Viscoelastic Under Uniaxial Tension. **Connective Tissue Research**, v. 44, p. 208 – 217, 2003.
- IKADA, Y. Challenges in tissue engineering. **J. R. Soc. Interface**, v. 3, p. 589–601, 2006.
- JACOBSON, M. J. Problem Solving About Complex Systems: Differences Between Experts and Novices. In B. Fishman & S. O'Connor-Divelbiss (Eds.), *Fourth International Conference of the Learning Sciences*, 2000. Mahwah, NJ: Erlbaum. 2000, p. 14 - 21.
- JAKLENEC, A., STAMP, A., DEWEERD, E., SHERWIN, A., LANGER, R. Progress in the Tissue Engineering and Stem Cell Industry “Are we there yet?”. **TISSUE ENGINEERING: Part B**, v. 18, n. 3, p. 155 – 166, 2012.
- JORGENSEN, A. M., CHOU, Z., GILLISPIE, G., LEE, S. J., YOO, J. J., SOKER, S., ATALA, A., Decellularized Skin Extracellular Matrix (dsECM) Improves the Physical and Biological Properties of Fibrinogen Hydrogel for Skin Bioprinting Applications. **Nanomaterials**, v. 10, n. 1484, p. 1 -10, 2020.
- KANE, D. A. Lactate oxidation at the mitochondria: a lactate-malate-aspartate shuttle at work. **Frontiers in Neuroscience**, v. 8, n. 366, p. 1 – 6, 2014.
- KAPALCZYŃSKA, M., KOLENDA, T., PRZYBYŁA, W., ZAJĄCZKOWSKA, M., TERESIAK, A., FILAS, V., IBBS, M., BLIŹNIAK, R., ŁUCZEWSKI, L., LAMPERSKA, K. 2D and 3D cell cultures – a comparison of different types of cancer cell cultures. **Arch Med Sci.**, v. 14, n. 4, p. 910–919, 2018.
- KAPFER, S. C., HYDE, S. T., MECKE, K., ARNS, C. H., SCHRÖDER-TURK, G. E. Minimal surface scaffold designs for tissue engineering. **Biomaterials** **32**, p. 6875 - 6882, 2011.
- KAUL, H., VENTIKOS, Y. Investigating biocomplexity through the agent-based paradigm. **Briefings in Bioinformatics Advance Access**, p. 1 – 16, 2013.

KILBURN, D. G., LILLY, M. D., WEBB, F. C. THE ENERGETICS OF MAMMALIAN CELL GROWTH. **J. Cell Sci.**, v. 4, p. 645 – 654, 1969.

KIM, B., LEE, S. B., LEE, J., CHO, S., PARK, H., YEOM, S., PARK, S. H. A Comparison Among Neo-Hookean Model, Mooney-Rivlin Model, and Ogden Model for Chloroprene Rubber. **International Journal of Precision Engineering and Manufacturing**, v. 13, n. 5, p. 759 – 764, 2012.

KIM, J., SHIN, K., KOH, Y., HAH, M. J., MOON, J., KIM, H. Production of Poly( $\epsilon$ -Caprolactone)/Hydroxyapatite Composite Scaffolds with a Tailored Macro/Micro-Porous Structure, High Mechanical Properties, and Excellent Bioactivity. **Materials**, v. 10, n. 1123, p. 1 – 13, 2017.

KIM, Y. S., SMOAK, M. M., MELCHIORRI, A. J., MIKOS, A. G. An Overview of the Tissue Engineering Market in the USA from 2011 to 2018. **Tissue Engineering Part A**, v. 0, n. 0, p. 1 – 8, 2018.

KIM, T., KIM, M. S., GOH, T. S., LEE, J. S., KIM, Y. H., YOON, S., LEE, C. Evaluation of Structural and Mechanical Properties of Porous Artificial Bone Scaffolds Fabricated via Advanced TBA-Based Freeze-Gel Casting Technique. **Appl. Sci.**, v. 9, n. 1965, p. 1 -17, 2019.

KOH, Y., LEE, J., KIM, Y. S., LEE, H. Y., KIM, H. J., KANG, K. Optimal mechanical properties of a scaffold for cartilage regeneration using finite element analysis. **Journal of Tissue Engineering**, v. 10, p. 1–10, 2019.

KULAWIAK, D. A., CAMLEY, B. A., RAPPEL, W. Modeling Contact Inhibition of Locomotion of Colliding Cells Migrating on Micropatterned Substrates. **PLoS Comput Biol**, v. 12, n. 12, p. 1 – 25, 2016.

KUMAR, G. S., PANDITHEVAN, P. Fractal tool paths for layered manufacturing of scaffolds with matched bone properties. **Innovative developments in design and manufacturing – Advanced Research in Virtual and Rapid Prototyping**, p. 1 -7, 2009.

KWON, T., PRENTICE, H., OLIVEIRA, J., MADZIVA, N., WARKIANI, E. M., HAMEL, J. P. HAN, J. Microfluidic cell retention device for perfusion of mammalian suspension culture. *Science Reports*, v. 7, n. 6703, p. 1 – 11, 2017.

LADYMAN, J., LAMBERT, J., WIESNER, K. What is a complex system?. **Euro Jnl Phil Sci**, v. 3, p. 33 – 67, 2013.

LANGER, R., VACANTI, J. P. Tissue Engineering. **SCIENCE**, v. 260, p. 920 – 926, 1993.

LANGHANS, S. A. Three-Dimensional in Vitro Cell Culture Models in Drug Discovery and Drug Repositioning. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, p. 1 – 14, 2018.

LARIVE, R. M., BAISAMY, L., URBACH, S., COOPMAN, P., BETTACHE, N. Cell membrane extensions, generated by mechanical constraint, are associated with a sustained lipid raft patching and an increased cell signaling. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1798, p. 389 – 400, 2010.

LEE, T. I., RINALDI, N. J., ROBERT, F., ODOM, D. T., BAR-JOSEPH, Z., GERBER, G. K., HANNETT, N. M., HARBISON, C. T., THOMPSON, C. M., SIMON, I., ZEITLINGER, J., JENNINGS, E. G., MURRAY, H. L., GORDON, D. B., REN, B., WYRICK, J. J., TAGNE, J., VOLKERT, T. L., FRAENKE, E., GIFFORD, D. K., YOUNG, R. A. Transcriptional Regulatory Networks in *Saccharomyces cerevisiae*. **Science**, v. 298, n. 5594, p. 799 – 804, 2002.

LEE, W., GUNTUR, A. R., LONG, F., ROSEN, C. J. Energy Metabolism of the Osteoblast: Implications for Osteoporosis. **Endocrine Reviews**, v. 38, n. 3, p. 255 – 266, 2017.

LEYDESDORFF, L., BORNMANN, L., MINGERS, J. Statistical Significance and Effect Sizes of Differences Among Research Universities at the Level of Nations and Worldwide Based on the Leiden Rankings. **JOURNAL OF THE ASSOCIATION FOR INFORMATION SCIENCE AND TECHNOLOGY**, v. 70, n. 5, p. 509–525, 2019.

- LEVIN, A., SHARMA, V., HOOK, L., GARCÍA-GARETA, E. The importance of factorial design in tissue engineering and biomaterials science: Optimisation of cell seeding efficiency on dermal scaffolds as a case study. **Journal of Tissue Engineering**, v. 9, p. 1 – 14, 2018.
- LI, D., WANG, Y. Coordination of cell migration mediated by site-dependent cell–cell contact. **PNAS**, v. 115, n. 42, p. 10678 – 10683, 2018.
- LI, Y., YAO, L., MORI, Y., SUN, S. X. On the energy efficiency of cell migration in diverse physical environments. **PNAS**, v. 116, n. 48, p. 23894 – 23900, 2019.
- LIBERMAN, A., KARIO, D., MUSSEL, M., BRILL, J., BUETOW, K., EFRONI, S., NEVO, U. Cell studio: A platform for interactive, 3D graphical simulation of immunological processes. **APL Bioengineering**, v. 2, n. 026107, p. 1 - 15, 2018.
- LIEN, S., KO, L., HUANG, T. Effect of pore size on ECM secretion and cell growth in gelatin scaffold for articular cartilage tissue engineering. **Acta Biomaterialia**, v. 5, p. 670 – 679, 2009.
- LIN, L., TONG, A., ZHANG, H., HU, Q., FANG, M. The Mechanical Properties of Bone Tissue Engineering Scaffold Fabricating Via Selective Laser Sintering. **LSMS**, v. 4689, pp. 146 – 152, 2007.
- LIU, W., WEBSTER, T. J. Toxicity and biocompatibility properties of nanocomposites for musculoskeletal tissue regeneration. **Nanocomposites for Musculoskeletal Tissue Regeneration**, p. 95–122, 2016.
- LIU, Y., CAO, L., ZHANG, S., JI, L., WANG, J., LIU, C. Effect of hierarchical porous scaffold on osteoimmunomodulation and bone formation. **Applied Materials Today**, v. 20, p. 1 – 16, 2020a.
- LIU, Y., YANG, S., CAO, L., ZHANG, X., WANG, J., LIU, C. Facilitated vascularization and enhanced bone regeneration by manipulation hierarchical pore structure of scaffolds. **Materials Science & Engineering C**, v. 110, p. 1 -13, 2020.
- LOCASALE, J. W., CANTLEY, L. C. Metabolic flux and the regulation of mammalian cell growth. **Cell Metab.**, v. 14, n. 4, p. 443 – 451, 2011.
- LÓPEZ-MEZA, J., ARAÍZ-HERNÁNDEZ, D., CARRILLO-COCOM, L. M., LÓPEZ-PACHECO, F., ROCHA-PIZAÑA, M. R., ALVAREZ, M. M. Using simple models to describe the kinetics of growth, glucose consumption, and monoclonal antibody formation in naive and infliximab producer CHO cells. **Cytotechnology**, v. 68, n. 4, p. 1287 – 1300, 2016.
- LOVECCHIO, J., GARGIULO, P., LUNA, J. L. V., GIORDANO, E., SIGURJÓNSSON, O. E. A standalone bioreactor system to deliver compressive load under perfusion flow to hBMSC-seeded 3D chitosan-graphene templates. **Scientific Reports**, v. 9, n. 16854, p. 1 – 11, 2019.
- LU, P., TAKAI, K., WEAVER, V. M., WERB, Z. Extracellular Matrix Degradation and Remodeling in Development and Disease. **Cold Spring Harb Prospect Biol.**, v. 3, n. 12, p. 1 – 24, 2011.
- LYSAGHT, M. J., NGUY, N. A. P., SULLIVAN, K. An Economic Survey of the Emerging Tissue Engineering Industry. **TISSUE ENGINEERING**, v. 4, n. 3, p. 231 – 238, 1998.
- LYSAGHT, M. J., HAZLEHURST, A. L. Tissue Engineering: The End of the Beginning. **TISSUE ENGINEERING**, v. 10, n. 1/2, p. 309 – 320, 2004.
- LYSAGHT, M. J., JAKLENEC, A., DEWEERD, E. Great Expectations: Private Sector Activity in Tissue Engineering, Regenerative Medicine, and Stem Cell Therapeutics. **TISSUE ENGINEERING: Part A**, v. 14, n. 2, p. 305 – 3015, 2008.
- LYSENKO, M., D'SOUZA, R. M. A Framework for Megascale Agent Based Model Simulations on Graphics Processing Units. **Journal of Artificial Societies and Social Simulation**, v. 11, n. 4, p. 1 – 17, 2008.
- MA'AYAN, A. Complex systems biology. **J. R. Soc. Interface**, n. 14, p. 1-9, 2017.

MACKENZIE, C. G., MACKENZIE, J. B., BECK, P. The effect of pH on growth, protein synthesis, and lipid-rich particles of cultured mammalian cells. **The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology**, v. 9, p. 141 – 156, 1961.

MAK, M., KIM, T., ZAMAN, M., KAMM, R. Multiscale Mechanobiology: Computational Models for Integrating Molecules to Multicellular Systems. **Integr. Biol.**, p. 1 – 40, 2015.

MATYJASZKIEWICZ, A., FIORE, G., ANNUNZIATA, F., GRIERSON, C. S., SAVERY, N. J., MARUCCI, L., BERNARDO, M. BSim 2.0: An Advanced Agent-Based Cell Simulator. **ACS Synth. Biol.**, v. 6, n. 10, p. 1969 – 1972, 2017.

MAYOR, R., ETIENNE-MANNEVILLE, S. The front and rear of collective cell migration. **NATURE REVIEWS | MOLECULAR CELL BIOLOGY**, p. 1 – 13, 2016.

MEHRAN, M., LAMBRECHTS, T., PAPANTONIOU, I., GERIS, L. Computational Modeling of Human Mesenchymal Stromal Cell Proliferation and Extra-Cellular Matrix Production in 3D Porous Scaffolds in a Perfusion Bioreactor: The Effect of Growth Factors. **Front. Bioeng. Biotechnol.**, v. 8, n. 376, p. 1 - 12, 2020.

MERCK. Glucose in Cell Culture. Disponível em: < <https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/technical-documents/technical-article/cell-culture-and-cell-culture-analysis/mammalian-cell-culture/glucose>>. Acesso em: 08 de julho de 2021.

MERKS, R. M. H., KOOLWIJK, P. Modeling Morphogenesis in silico and in vitro: Towards Quantitative, Predictive, Cell-based Modeling. **Math. Model. Nat. Phenom.**, v. 4, n. 4, p. 149-171, 2009.

MICHL, J., PARK, K. C., SWIETACH, P. Evidence-based guidelines for controlling pH in mammalian live-cell culture systems. **Communications Biology**, v. 2, n. 144, p. 1 - 12, 2019.

MILO, R., SHEN-ORR, S., ITZKOVITZ, S., KASHTAN, N., CHKLOVSKII, D., ALON, U. Network Motifs: Simple Building Blocks of Complex Networks. **Science**, v. 298, n. 5594, p. 824 – 827, 2002.

MILO, R., JORGENSEN, P., MORAN, U., WEBER, G., SPRINGER, M. BioNumbers—the database of key numbers in molecular and cell biology. **Nucleic Acids Res.**, v. 38(Database issue), p. D750–D753, 2010.

MINITAB. Interpretar os principais resultados para Análise de experimento fatorial. Disponível em: < <https://support.minitab.com/pt-br/minitab/20/help-and-how-to/statistical-modeling/doe/how-to/factorial/analyze-factorial-design/interpret-the-results/key-results/?SID=128050#step-4-determine-whether-your-model-meets-the-assumptions-of-the-analysis>>. Acesso em: 23 de julho de 2021.

MITCHELL, M., NEWMAN, M. Complex systems theory and evolution (2001). Disponível em: < <http://www-personal.umich.edu/~mejn/papers/cs.ps>>. Acesso em: 27 de julho de 2021.

MOKHTARI-JAFARI, F., AMOABEDINY, G., HAGHIGHIPOUR, N., ZARGHAM, R., SAATCHI, A., AKBARI, J., SALEHI-NIK, N. Mathematical modeling of cell growth in a 3D scaffold and validation of static and dynamic cultures. **Eng. Life Sci.**, v. 16, p. 290–298, 2016.

MOOKERJEE, S. A., GERENCSEK, A. A., NICHOLLS, D. G., BRAND, M. D. Quantifying intracellular rates of glycolytic and oxidative ATP production and consumption using extracellular flux measurements. **J. Biol. Chem.**, v. 292, n. 17, p. 7189 – 7207, 2017.

MORIN, E. Introdução ao pensamento complexo. Tradução de Eliane Lisboa. 3. ed. Porto Alegre: Sulina, 2007. 120 p.

MURPHY, C. M., O'BRIEN, F. J. Understanding the effect of mean pore size on cell activity in collagen-glycosaminoglycan scaffolds. **Cell Adh Migr.**, v. 4, n. 3, p. 377 – 381, 2010.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (2021). PubChem. Disponível em: < <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Acesso em: 30 de maio de 2021.



NATURE EDUCATION. Cell Signaling. Disponível em: < <https://www.nature.com/scitable/topicpage/cell-signaling-14047077/>>. Acesso em: 10 de fevereiro de 2021.

NAVA, M. M., DRAGHI, L., GIORDANO, C., PIETRABISSA, R. The Effect of Scaffold Pore Size in Cartilage Tissue Engineering. **Journal of Applied Biomaterials & Functional Materials**, v. 14, n. 3, p. 223 – 229, 2016.

NICOLETTI, M. C., JAIN, L. Computational Intelligence Techniques for Bioprocess Modelling, Supervision and Control. Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2009.

NUNEZ-IGLESIAS, J., BLANCH, A. J., LOOKER, O., DIXON, M. W., TILLEY, L. A new Python library to analyse skeleton images confirms malaria parasite remodelling of the red blood cell membrane skeleton. **PeerJ**, v. 6, p. 1-10, 2018.

NURSE, P., HAYLES, J. The Cell in an Era of Systems Biology. **Cell**, v. 144, n. 6, p. 850 - 854, 2011.

NYBERG, E., O'SULLIVAN, A., GRAYSON, W. scafSLICR: A MATLAB-based slicing algorithm to enable 3D-printing of tissue engineering scaffolds with heterogeneous porous microarchitecture. **PLoS ONE**, v. 14, n. 11, p. 1 – 11, 2019.

O'BRIEN, F. J. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. **Materials Today**, v. 14, n. 3, p. 88-95, 2011.

OLIVARES, A. L., LACROIX, D. Simulation of Cell Seeding Within a Three-Dimensional Porous Scaffold: A Fluid-Particle Analysis. **Tissue Engineering: Part C**, v. 18, n. 8, p. 624 – 631, 2012.

OLTVAI, Z. N., BARABÁSI, A. Life's Complexity Pyramid. **Science**, v. 298, n. 5594, p. 763 – 764, 2002.

OPENCV. **Getting Started with Images**. Disponível em: < [https://opencv-python-tutroals.readthedocs.io/en/latest/py\\_tutorials/py\\_gui/py\\_image\\_display/py\\_image\\_display.html](https://opencv-python-tutroals.readthedocs.io/en/latest/py_tutorials/py_gui/py_image_display/py_image_display.html)>. Acesso em: 15 de Agosto de 2020.

PARK, S., REIMONN, T. M., AGARABI, C. D., BRORSON, K. A., YOON, S. Metabolic Responses and Pathway Changes of Mammalian Cells Under Different Culture Conditions with Media Supplementations. **Biotechnol. Prog.**, v. 34, n. 3, p. 793 – 805, 2018.

PEREIRA, S. H., COUTINHO, D. S. M., MATOS, A. F. O. G., JUNIOR, W. F. S., FABRINO, D. L. Three-dimensional cell culture, opportunities and challenges for bioprocess engineers. **Brazilian Journal of Biological Sciences**, v. 3, n. 6, p. 263-277, 2016.

PEIRCE, S. M., GIESON, E. J., SKALAK, T. C. Multicellular simulation predicts microvascular patterning and in silico tissue assembly. **The FASEB Journal**, v. 18, n. 6, p. 731-733, 2004.

PILLOW. **Handbook**. Disponível em: < <https://pillow.readthedocs.io/en/stable/handbook/index.html>>. Acesso em: 15 de Agosto de 2020.

PLACE, T. L., DOMANN, F. E., CASE, E. J. Limitations of oxygen delivery to cells in culture: An underappreciated problem in basic and translational research. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 113, p. 311 – 322, 2017.

PORTNER, R., BOHMANN, A., LUDEMANN, I., MAIRK, H. Estimation of specific glucose uptake rates in cultures of hybridoma cells. **Journal of Biotechnology**, v. 34, p. 237 – 246, 1994.

PROMOCELL. **Scaling up from 2D monolayers to complex 3D cell cultures**. Disponível em: < <https://www.promocell.com/in-the-lab/scaling-up-from-2d-to-complex-3d-cell-culture/>>. Acesso em: 15 de janeiro de 2020.

QU, Z., WEISS, J. N., MACLELLAN, W. R. Coordination of cell growth and cell division: a mathematical modeling study. **Journal of Cell Science**, v. 117, n. 18, p. 4199 – 4207, 2004.

QU, F., PINTAURO, M. P., HAUGHAN, J., HENNING, E. A., ESTERHAI, J. L., SCHAER, T. P., MAUCK, R. L., FISHER, M. B. Repair of Dense Connective Tissues via Biomaterial-Mediated Matrix Reprogramming of the Wound Interface. **Biomaterials**, v. 39, p. 85 – 94, 2014.

RABINOWITZ, J. D., ENERBÄCK, S. Lactate: the ugly duckling of energy metabolism. **Nature Metabolism**, v. 2, p. 566 – 571, 2020.

RINGER, P., COLO, G., FASSLER, R., GRASHOFF, C. Sensing the Mechano-Chemical Properties of the Extracellular Matrix. **Matrix Biol.**, v. 64, p. 6 – 14, 2017.

ROCHE. **Roche Biochemical Pathways**. Disponível em: < <http://biochemical-pathways.com/#/map/1>>. Acesso em: 15 de novembro de 2021.

RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ, C. O., TORRES-GARCÍA, S. E., OLVERA-SANDOVAL, C., RAMÍREZ-CASTILLO, F. Y., MURO, A. L., AVELAR-GONZALEZ, F. J., GUERRERO-BARRERA, A. L. Cell Culture: History, Development and Prospects. **Int.J.Curr.Res.Aca.Rev.**, n. 2, v. 12, p. 188-200, 2014.

SÁNCHEZ-DE-DIEGO, C., ARTIGAS, N., PIMENTA-LOPES, C., VALER, J. A., TORRE JON, B., GAMA-PÉREZ, P., VILLENA, J. A., GARCIA-ROVES, P. M., ROSA, J. L., VENTURA, F. Glucose Restriction Promotes Osteocyte Specification by Activating a PGC-1 $\alpha$ -Dependent Transcriptional Program. **iScience**, v. 15, p. 79 – 94, 2019.

SCAGLIONE, S., CESERACCIU, L., AIELLO, M., COLUCCINO, L., FERRAZZO, F., GIANNONI, P., QUARTO, R. A Novel Scaffold Geometry for Chondral Applications: Theoretical Model and in Vivo Validation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 111, n. 10, p. 2107 - 2119, 2014.

SCIKIT-IMAGE. **Image processing in Python**. Disponível em: < <https://scikit-image.org/>>. Acesso em: 15 de agosto de 2020.

SCHURR, A. Lactate, Not Pyruvate, Is the End Product of Glucose Metabolism via Glycolysis. In CALISKAN, M., KAVAKLI, I. H., OZ, G. C. Carbohydrate. IntechOpen, 2017, p. 22-35. Disponível em: <<https://www.intechopen.com/books/carbohydrate/lactate-not-pyruvate-is-the-end-product-of-glucose-metabolism-via-glycolysis>>. Acesso em: 17 de agosto de 2020.

SEEKHAO, N., SHUNG, C., JAJA, J., MONGEAU, L., LI-JESSEN, N. Y. K. Real-Time Agent-Based Modeling Simulation with in-situ Visualization of Complex Biological Systems A Case Study on Vocal Fold Inflammation and Healing. **IEEE Int Symp Parallel Distrib Process Workshops Phd Forum**, v. 2016, p. 463 – 472, 2016.

SHANKAR, E., WEIS, M. C., AVVA, J., SHUKLA, S., SHUKLA, M., SREENATH, S. N., GUPTA, S. Complex Systems Biology Approach in Connecting PI3K-Akt and NF- $\kappa$ B Pathways in Prostate Cancer. **Cells**, v. 8, n. 201, p. 1 – 13, 2019.

SHANSKII, Y. D., SERGEEVA, N. S., SVIRIDOVA, I. K., KIRAKOZOV, M. S., KIRSANOVA, V. A., AKHMEDOVA, S. A., ANTOKHIN, A. I., CHISSOV, V. I. Human Platelet Lysate as a Promising Growth-Stimulating Additive for Culturing of Stem Cells and other Cell Types. **Cell Technologies in Biology and Medicine**, v. 3, p. 146 – 151, 2013.

SHKARIN, R., SHKARIN, A., SHKARINA, S., CECILIA, A., SURMENEV, R. A., SURMENEVA, M. A., WEINHARDT, V., BAUMBACH, T., MIKUT, R. Quanfima: An open-source Python package for automated fiber analysis of biomaterials. **PLoS ONE**, v. 14, n. 4, p. 1 – 20, 2019.

SIEGENFELD, A. F., BAR-YAM, Y. An Introduction to Complex Systems Science and Its Applications. **Hindawi Complexity**, v. 2020, n. 6105872, p. 1 – 16, 2020.

SMITH, A. S., PASSEY, S., GREENSMITH, L., et al. Characterization and optimization of a simple, repeatable system for the long-term in vitro culture of aligned myotubes in 3D. **J Cell Biochem**, v. 2, n. 113, p. 1044–1053, 2012.

STEPHENS, N., KING, E. & LYALL, C. Blood, meat, and upscaling tissue engineering: Promises, anticipated markets, and performativity in the biomedical and agri-food sectors. **BioSocieties**, v. 13, p. 368–388, 2018.

SUN, T., MCMINN, P., HOLCOMBE, M., SMALLWOOD, R., MACNEIL, S. Agent Based Modelling Helps in Understanding the Rules by Which Fibroblasts Support Keratinocyte Colony Formation. **PLoS ONE**, v. 3, n. 5, p. 1 – 17, 2008.

TAN, T., PEH, G. S. L., FINKELSTEIN, E. A., MEHTA, J. S. A practical model for economic evaluation of tissue-engineered therapies. **WIREs Syst Biol Med**, v. 7, p. 91–100, 2015.

THERMOFISHER SCIENTIFICA. DMEM, high glucose. Disponível em: < <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/11965084#/11965084>>. Acesso em: 07 de julho de 2021.

THERMOFISHER SCIENTIFICb. Dulbecco's Modified Eagle Medium (D-MEM) (1X) liquid (high glucose). Disponível em: < <https://www.thermofisher.com/dk/en/home/technical-resources/media-formulation.183.html>>. Acesso em: 23 de julho de 2021.

TORII, R., VELLIUO, R., HODGSON, D., MUDERA, V. Modelling multi-scale cell–tissue interaction of tissue-engineered muscle constructs. **Journal of Tissue Engineering**, v. 9, p. 1–9, 2018.

TURNBULL, G., CLARKE, J., PICARD, F., RICHES, P., JIA, L., HAN, F., LI, B., SHU, W. 3D Bioactive composite scaffolds for bone tissue engineering. **Bioactive Materials** 3, p. 278 – 314, 2018.

VAN DER WALT, S., SCHONBERGER, J. L., NUNEZ-IGLESIAS, J., BOULOGNE, F., WARNER, J. D., YAGER, N., GOUILLART, E., YU, T. scikit-image: image processing in Python. **PeerJ**, p. 1-18, 2014.

VELASCO, M. A., LANCHEROS, Y., GARZÓN-ALVARADO, D. A. Geometric and mechanical properties evaluation of scaffolds for bone tissue applications designing by a reaction-diffusion models and manufactured with a material jetting system. **Journal of Computational Design and Engineering**, v. 3, n. 4, p. 385 – 397, 2016.

WASYŁECZK, M., SIKORSKA, W., CHWOJNOWSKI, A. Review of Synthetic and Hybrid Scaffolds in Cartilage Tissue Engineering. **Membranes**, v. 10, n. 348, p. 1 – 28, 2020.

WATERLOO INSTITUTE FOR COMPLEXITY & INNOVATION. **What are complex systems?**. Disponível em: < <https://uwaterloo.ca/complexity-innovation/about/what-are-complex-systems>>. Acesso em: 10 de janeiro de 2020.

WASYŁECZKO, M., SIKORSKA, W., CHWOJNOWSKI, A. Review of Synthetic and Hybrid Scaffolds in Cartilage Tissue Engineering. **Membranes**, v. 10, n. 348, p. 1 -28, 2020.

WILENSKY, U., RAND, W. An introduction to agent-based modeling: modeling natural, social, and engineered complex systems with NetLogo. London: MIT Press, 2015.

XU, G., SHI, Y. Apoptosis signaling pathways and lymphocyte homeostasis. **Cell Research**, v. 17, p. 759–771, 2007.

YAMAJI, H., FUKUDA, H. Growth kinetics of animal cells immobilized within porous support particles in a perfusion culture. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 42, p. 531 – 535, 1994.

YAN, X., BERGSTROM, D. J., CHEN, X. B. Modeling of Cell Cultures in Perfusion Bioreactors. **IEEE TRANSACTIONS ON BIOMEDICAL ENGINEERING**, v. 59, n. 9, p. 2568 – 2575, 2012.

YAP, B., KAMM, R. Cytoskeletal remodeling and cellular activation during deformation of neutrophils into narrow channels. **Journal of Applied Physiology**, v. 99, p. 2323–2330, 2005.

YU, J. S., BAGHERI, N. Agent-Based Models Predict Emergent Behavior of Heterogeneous Cell Populations in Dynamic Microenvironments. **Front. Bioeng. Biotechnol.**, v. 8, n. 249, p. 1 – 22, 2020.

ZETTERBERG, A., LARSSON, O. Cell cycle progression and cell growth in mammalian cells: kinetic aspects of transition events. In *Cell Cycle Control* (ed. Hutchinson, C., Glover, D. M.), p. 206-227. UK: Oxford University Press, 1995.

ZHANG, Z., BEDDER, M., SMITH, S. L., WALKER, D., SHABIR, S., SOUTHGATE, J. Characterization and classification of adherent cells in monolayer culture using automated tracking and evolutionary algorithms. **Biosystems**, v. 146, p. 110 – 121, 2016.

## APÊNDICE A – ANÁLISE COMPARATIVA DA LITERATURA RELACIONADA

Tabela 6 – Comparação e análise de modelos baseado em agentes aplicados à cultura de células e de tecidos

Tipo de célula/sistema biológico	Classificação do comportamento	Regras do modelo	Características do modelo	Escala temporal e espacial	Linguagem de programação/software	Pos/ Pontos positivos	Contras/ Pontos negativos	Resultados	Referências
Células tumorais Células nervosas entéricas	Migração Proliferação	Movimentação estocástica das células ao longo da malha (agentes são escolhidos aleatoriamente e se deslocam para uma das 4 direções com $p = 25\%$ ). O comprimento das células cresce exponencialmente com o tempo, a uma taxa $\alpha$ , pela inserção aleatória de novas células. Após a movimentação, a célula tenta se proliferar com probabilidade $P = 0,05$ e as células filhas posicionam-se adjacientemente.	Estrutura de autômato celular em <i>lattices</i> de comprimento e largura variáveis (2D). População inicial de células idêntica e uniformemente distribuída. Não foram consideradas morte ou diferenciação das células. Condições de contorno periódicas são aplicadas para manter a geometria cilíndrica do <i>lattice</i> . Atualizações do modelo ocorrem de modo assíncrono. Simulação encerrada a um número máximo de células = 6524.	Uma célula unitária representa o diâmetro de uma célula (10 $\mu\text{m}$ ) biológica. O comprimento do autômato celular ( $Y = 50$ ) corresponde a 500 $\mu\text{m}$ . Cada passo da simulação corresponde a 15 min Velocidade média das células = 40 $\mu\text{m}/\text{h}$	Não especificado	O modelo é capaz de reproduzir o padrão genealógico observado nos experimentos	Modelo simula um deslocamento bidimensional, quando no modelo experimental, pode haver formação de camadas e deslocamentos tridimensional; alta variabilidade da curva de Lorenz (simulação) e divergência da curva obtida experimentalmente;	Emergência da dominação da população final por um pequeno grupo de células progenitoras ( <i>superstars</i> ). Auto-organização da população é previsível, mas a dominação clonal é estocástica, a qual demonstrou ser uma característica importante na formação do ENS. Proliferação das <i>superstars</i> caracteriza-se como uma forma de competição por recursos (nutriente, espaço, fatores de crescimento). Posição dos progenitores na onda de invasão é importante; proliferação é afetado pelo volume de exclusão e o aumento de sua probabilidade, aumenta a predominância de poucas <i>superstars</i>	CHEESEM AN; ZHANG; BINDER, NEGWEE N, et al., 2014
Célula muscular	Migração Contração	A força de contração no elemento é calculada pela força das células contida no cubo. A força contrátil é distribuída pelos elementos das bordas, possibilitando o cálculo da tensão principal; as células são reorientadas na direção da força principal.	Células são representadas por agentes, sem dimensão, e posicionadas (inicialmente) aleatoriamente ao longo do espaço cúbico. A tensão resultante do conjunto de células é transferida para as bordas do elemento e a equação de equilíbrio de tensões na malha da matriz extracelular é calculada pelo método dos elementos finitos.	O arcabouço é desenhado em escala de centímetros, sendo que cada elemento contém inúmeras células em escala de micrômetros. A rotina do programa é executada a cada 1 hora por um período de 7 dias computacionais	MATLAB e ANSYS	O modelo mimetiza a biomecânica de uma rede de células musculares interconectadas, reproduzindo a formação de sulco no tecido muscular. Utilização de dados experimentais	Outras características essenciais de um sistema celular não são avaliadas (como divisão celular e energia metabólica), as quais podem alterar os resultados obtidos.	A tendência de redução linear da área do tecido muscular simulado ao longo do tempo de cultivo se assemelha grandemente à tendência observada experimentalmente. A redução da área foi de 39% no modelo in vitro e de 36% no modelo in silico.	TORII; VELLIU; HODGSON; MUJDERA, 2018

Tipo de célula/sistema biológico	Classificação do comportamento	Regras do modelo	Características do modelo	Escala temporal e espacial	Linguagem de programação/software	Pos/ Pontos positivos	Contras/ Pontos negativos	Resultados	Referências
Não especificado	Migração Proliferação Colisão Inibição por contato	Células estão confinadas nos limites superior e inferior do <i>scaffold</i> , mas podem transpor os limites esquerdo e direito, uma vez que apresentam planos simétricos. O ciclo celular é regulado pela concentração de oxigênio ao longo do <i>scaffold</i> , a qual é continuamente descrita pela equação diferencial parcial que descreve o fenômeno de reação-difusão, cuja solução é obtida pela discretização do espaço e do tempo em diferenças finitas (de ordem muito menor que os tempos de reprodução e deslocamento das células).	Autômato celular onde cada célula computacional representa uma célula (sistema biológico). As células se movimentam e proliferam reguladas pelos nutrientes necessários (glicose, oxigênio). Assume-se que o <i>scaffold</i> é altamente poroso para permitir a migração de células em todas as direções em caminhadas aleatórias (não são considerados deslocamentos por quimiotaxia ou haptotaxia para glicoproteínas da MEC). As células mantêm a direção de deslocamento durante um período determinado antes de mudar a sua direção e cessam tal movimento após ocorrer uma colisão célula-célula. O campo de nutrientes que regula o ciclo celular é governado pela equação diferencial de ação-difusão (distribuição contínua de nutrientes).	Células unitárias quadradas de comprimento $\Delta L=8,5\text{mm}$ (baseado nas dimensões de condrócitos), espaço de dimensões $0,25 \times 0,116\text{cm}$ ( $588 \times 68$ células). A velocidade das células varia de $8,5$ a $25,5 \mu\text{m/h}$ sendo o tempo de passo da célula é igual a $\Delta L/\text{velocidade}$ .	Não especificado	Inclusão de regras de comportamento celular não abordadas em outros modelos (colisão) e tempos de comportamento os que reproduzem o metabolismo celular. O cálculo de nutrientes pelo modelo de reação-difusão descreve o gradiente de concentração promovido pelo consumo pelas células (presente nos termos $\xi(x)$ ).	Modelo bidimensional que desconsidera a morte celular e o espaço ocupado pelo <i>scaffold</i> . O modelo desconsidera as diferenças do coeficiente de difusão efetivo no espaço vazio dos poros e na matriz extracelular, o que reduz a disponibilidade de nutrientes para células do interior da colônia.	Os resultados obtidos para velocidades das células determinadas estocástica e deterministicamente foram similares. A taxa de ocupação das células computacionais por células "vivas" é maior (nos primeiros 10 dias) quando as células possuem velocidade igual a $25,5 \mu\text{m/h}$ ; após 20 dias, tal taxa é aproximadamente a mesma para as três velocidades. A inoculação de células no meio do <i>scaffold</i> demonstrou ser a melhor condição dentre as comparadas, apresentando maior ocupação do espaço, menor fração de colisão de células ao fim do cultivo e crescimento da inibição por contato mais tardiamente. Os modos de inoculação uniforme e pelo meio e laterais apresentaram comportamento semelhante, sendo que o mesmo foi observado para as inoculações pelas bordas e nos limites superior e inferior.	CHUNG; LIN; CHEN; HUANG, 2010

Tipo de célula/sistema biológico	Classificação do comportamento	Regras do modelo	Características do modelo	Escala temporal e espacial	Linguagem de programação/software	Pos/ Pontos positivos	Contras/ Pontos negativos	Resultados	Referências
Não especificado	Migração Proliferação Colisão Inibição por contato	Cada célula unitária comporta no máximo uma célula no tempo $t$ , tendo, portanto, os status vazio ou ocupado. As células interagem e tomam decisões baseadas em sua vizinhança de von Neumann, e escolhem qual espaço vazio ocuparão baseado em uma probabilidade igual para todos os espaços vacantes da vizinhança.	Autômato celular em três dimensões, onde cada célula unitária representa uma célula (sistema biológico), representado por um vetor contendo diferentes informações dos estados celulares. O modelo considera que as células se deslocam ao longo de um meio altamente poroso, de modo que elas possam se movimentar livremente, além de considerar a concentração de nutrientes uniforme e constante. As condições iniciais foram: autômato de volume $100 \times 100 \times 100$ , com número de células igual a 0,1% da fração de volume do autômato, velocidade de $10 \mu\text{m/h}$ , tempo de persistência de 0,4 h e tempo do ciclo celular de 20 h.	A dimensão dos fenômenos de comportamento celular (tempo de divisão celular, tempo no modo estacionário) é medida em hora (h) e a escala espacial é medida em $\mu\text{m}$ , resultando assim em velocidades da ordem de 0 a $60 \mu\text{m/h}$ .	Não especificado	Modelo desenvolvido em 3D que compara diferentes formas de inoculação.	Desconsideração da porosidade do <i>scaffold</i> , morte celular e gradiente de concentração de nutrientes.	Embora o aumento da velocidade de migração das células eleve a capacidade de regeneração do tecido pelo deslocamento das células, velocidades maiores que $5 \mu\text{m/h}$ levam à perda desta vantagem em cultivos com células inicialmente uniformemente inoculadas. Este resultado se mostrou diferente quando as células foram inoculadas em uma extremidade do <i>scaffold</i> , possibilitando a locomoção ininterrupta das células.	CHENG; YOUSSE; MARKENS COFF; ZYGOURA KIS, 2006

Tipo de célula/sistema biológico	Classificação do comportamento	Regras do modelo	Características do modelo	Escala temporal e espacial	Linguagem de programação/software	Pos/ Pontos positivos	Contras/ Pontos negativos	Resultados	Referências
Queratinócitos e fibroblastos	Migração Proliferação Diferenciação	Moléculas da matriz extracelular, tais como colágeno V e laminina I, foram simuladas como alteração da cor do tecido e produzidas pelo contato queratinócito-fibroblasto, resultando em maior proliferação dos queratinócitos. O contato entre queratinócitos e fibroblastos estimula a proliferação de queratinócitos antes de se atingir a confluência da placa.	Os diversos fatores de crescimento, inibição e citocinas são descritos de forma genérica no modelo (por exemplo, fatores de crescimento são representados de forma genérica pelo SFB. Todos os fibroblastos foram genericamente classificados como proliferativos ou não proliferativos. Os fibroblastos não proliferativos foram simulados exatamente como os proliferativos, mas com as funções de migração e divisão desativadas e adesão reduzida.	Cada interação corresponde a 30 minutos. As células são representadas por esferas não deformáveis de 20 $\mu\text{m}$ , que interagem em uma placa plana de dimensões 500 $\mu\text{m}$ x 500 $\mu\text{m}$ . Velocidade das células com característica de migração: 1 $\mu\text{m}/\text{min}$ . Ciclo celular de queratinócitos de 60 h e de 20 h para fibroblastos proliferativos	FLAME - plataforma de modelagem baseada em agentes de alta complexidade	Modelagem de interação complexa entre células de diferentes linhagens, sinalizações parácrina e autócrina, bem como inibição por contato.	Simulação de placa plana em 2D, desconsidera o metabolismo celular e condições do ambiente (oxigênio, nutriente, etc)	Os resultados mostraram que a taxa de crescimento de colônias de queratinócitos é altamente influenciada pela proporção entre fibroblastos e queratinócitos, devendo essa razão ser ótima no início da co-cultura, o que possibilita a cultura de queratinócitos sem a suplementação com SFB; além disso, fibroblastos não mutados quanto à capacidade de proliferação seriam mais eficazes no crescimento das colônias de queratinócitos do que as células irradiadas tradicionalmente utilizadas nos protocolos. A heterogeneidade (quanto ao estado de diferenciação) dos fibroblastos inoculados é importante para a formação de colônias de queratinócitos. Altas proporções de fibroblasto e taxa de crescimento reduzem a proliferação de queratinócitos; a suplementação de fibroblastos antes da diferenciação de queratinócitos proliferativos aumenta o % de ocupação da placa por queratinócitos, mas não surte efeito quando fibroblastos irradiados são suplementados.	SUN; MCMINN; HOLCOM; SMALLWO OD; MACNEIL, 2008



Tipo de célula/sistema biológico	Classificação do comportamento	Regras do modelo	Características do modelo	Escala temporal e espacial	Linguagem de programação/software	Pos/ Pontos positivos	Contras/ Pontos negativos	Resultados	Referências
Bacteria Células do Sistema imune Tecidos	Migração Nutrição Sinalização Proliferação Apoptose Angiogênese	Cada célula possui um dos 7 estados: quiescente, migratório, proliferativo, apoptótico, necrótico, senescente, e indecيدido. Caso o tempo de vida da célula seja maior que a vida útil definida, a célula morre (removida do modelo). Caso esteja sistematicamente sem nutrientes, a célula entra em estado necrótico e aguarda até que haja nutriente. Caso a célula tenha energia suficiente e haja moléculas sinalizadoras, ela se desloca para um dos nós do espaço hexagonal; caso ela tenha dobrado de tamanho, tenha se passado o tempo de síntese de DNA e não haja inibição por contato, ela se divide. Regras que sofrem inibição por contato se tornam quiescentes; células em estado indefinido podem se tornar proliferativas ou migratórias dependendo da sinalização celular.	Modelo baseado em agentes flexível operado com os pacotes de ferramentas simulação (sim), agentes (agent), ambientes (env), visualização (vis) e utilidade (util). O pacote agentes inclui os componentes/funções Cell (tecido, células do sistema imune, bactérias), Module (simulam substâncias das células, tais como metabolismo ou sinalização celular, ou angiogêneses) e Helper (mecanismo de introdução de perturbações externas ao sistema ou postergações de ações das células); o pacote Ambiente inclui os componentes Grid (camada onde os agentes se encontram, podendo assumir geometrias hexagonais, retangular ou contínua), Lattice (rede que captura a movimentação de moléculas), Componente e Localização. Os dados de entrada, definidos com um arquivo XML (.xml), são importados para criar uma série de simulação. Dentro da série de simulação, para cada criação/inoculação aleatória, uma instância de simulação é criada. Ambientes e agentes são adicionados à instância de simulação. A simulação é executada a cada unidade de tempo, e os resultados são exportados para um arquivo JSON (.json). Alternativamente, a simulação pode ser executada no modo GUI para visualização em tempo real.	Cada unidade de tempo ( <i>tick</i> ) corresponde a 1 minuto; os fenômenos são analisados ao longo de 14 dias. Cada célula possui de 25 a 40 µm. Cada hexágono tem 30 µm de diâmetro (lado a lado) e contém, em média, 2-3 células dependendo do volume total de células. O grid possui 34 hexágonos em raio com uma margem de 6 hexágonos, correspondente a um diâmetro total de aproximadamente 2 mm.	O ARCADE (ABM) é construído em Java, usando a biblioteca MASON para agendamento e simulação de vários agentes.	Programa flexível, possibilitando a simulação de cultura de diferentes células e tecidos. O modelo possui regras complexas de metabolismo e sinalização celular, sendo considerada a energia obtida da glicólise e fosforilação oxidativa, bem como o consumo de energia de manutenção, proliferação e deslocamento. A célula de divide baseado em sua energia e volume crítico. O modelo possibilita a simulação 3D por meio de sobreposição de camadas 2D.	As células se movimentam livremente pelo Grid, exceto quando há inibição por contato (ausência de mimetização de <i>scaffold</i> ).	Os autores simulam 3 estudos de caso. Os autores demonstram que há diferenças no comportamento emergente entre os contextos de colônia de células e tecido. Além disso, foram verificadas consequências lineares, não lineares e multimodais de variação de parâmetros na competição em Co-culturas simuladas. Por fim, foi demonstrado o impacto variável da heterogeneidade celular e populacional em resultados emergentes. A estrutura do modelo é facilmente modificada para explorar numerosos sistemas biológicos, de microambientes tumorais a microbiomas. O núcleo de colônia é composto majoritariamente de células quiescentes. Fenômenos emergente dependem da heterogeneidade de colônias e tecidos. Maior heterogeneidade geralmente corresponde a maior taxa de crescimento, menor simetria, e comprimentos de ciclo mais longos.	YU; BAGHE, 2020

Tipo de célula/sistema biológico	Classificação do comportamento	Regras do modelo	Características do modelo	Escala temporal e espacial	Linguagem de programação/software	Pos/ Pontos positivos	Contras/ Pontos negativos	Resultados	Referências
Tecido ósseo Tecido cartilaginoso Células produtoras e não produtoras de MEC	Migração Apoptose Nutrição Inibição por contato Produção e remodelagem de MEC Quimiotaxia	Células obtêm energia pelo catabolismo de glicose ou lactato (geração de ATP). Em condições favoráveis de crescimento, células produtoras de MEC excretam MEC, alterando a estrutura dos poros. Caso a célula não esteja ancorada à matriz, ela se desloca por quimiotaxia (fatores de crescimento) caso não haja inibição por contato. Cada célula verifica a sua atual fase do ciclo celular e as condições de crescimento no microambiente. Caso o tempo de permanência na fase do ciclo celular atual tenha sido completado, a célula muda de fase do ciclo celular, podendo se dividir, produzir MEC ou enzimas que degradem a matriz extracelular. Cada célula verifica se sua energia foi completamente exaurida ou se atingiu o estado de apoptose celular.	Moléculas e células se deslocam apenas pelos poros do <i>scaffold</i> gerado pelo algoritmo de simulação de matriz hexaédrica com poros aleatoriamente interconectados. As concentrações das moléculas são determinadas por suas concentrações iniciais, taxas de alimentação, deslocamento e consumo por células. As decisões das células são tomadas baseado nas condições de seu microambiente, definido por sua vizinhança de Moore. Uma quantidade de energia proporcional ao comprimento do deslocamento é gasta na migração, ou caso a célula se mantenha estática, uma quantidade de energia para manutenção da homeostase é demandada. Cada célula avalia se as concentrações de glicose, oxigênio e lactato em sua vizinhança de Moore 3D estão acima do limite crítico de glicose, do pH crítico e nível crítico (apoxia) de oxigênio, respectivamente, para determinar a favorabilidade do crescimento celular. O volume das células é calculado por interpolação entre os volumes e energia máximo e mínimo.	Cada unidade de tempo $t_n$ corresponde a 1 hora Cada voxel possui comprimento de 20 $\mu\text{m}$ , podendo comportar, no mínimo 2 células, dependendo de seu volume	Python 3.7.6	O modelo permite a simulação de cultivo de tecido com interação entre células e <i>scaffold</i> tridimensional e moléculas. As moléculas são tratadas como agentes e se deslocam em movimento browniano. O modelo simula os efeitos de microambiente em cultura de células em <i>scaffold</i> e comportamento metabólicos e de ciclo celular complexos. Possibilidade de simulação de cultivos no modo estático e perfusão.	Baixa capacidade de escalonamento do modelo e visualização em tempo real	O modelo reproduziu o perfil de crescimento celular e consumo de nutrientes de experimentos <i>in vitro</i> . O diâmetro mais adequado do <i>scaffold</i> é 20 $\mu\text{m}$ . O cultivo em perfusão apresenta maior complexidade computacional que no modo estático. As condições iniciais do cultivo alteram a complexidade energética e formação do tecido.	SILVA JR, 2021 (presente trabalho)

Fonte: Willer Ferreira da Silva Junior, 2021.

## APÊNDICE B – RELAÇÃO DE VARIÁVEIS E ESCALA DO MODELO

Tabela 7 - Relação entre as variáveis, suas escalas e ordens de grandeza

Variável do modelo	Representação no programa	Classificação	Linhagem celular	Tipo de scaffold	Magnitude literatura (Min, Max)		Unidade	Variável de referência	Observação	Referências	Magnitude corrigida* (Min, Max)	
Iterador de ações moleculares	m	Numérica Discreta Dimensão temporal Parâmetro fixo	N/A	N/A	0,00E+00	n_to_min	min	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Volume da célula	cella_volume	Numérica Contínua Dimensão espacial Parâmetro variável de acordo com a energia	Célula de mamíferos	N/A	1,00E+03	4,00E+03	$\mu\text{m}^3$	N/A	N/A	BNID106738 BNID105906	N/A	N/A
			Fibroblasto humano	N/A	N/A	2,26E+03	$\mu\text{m}^3$			BNID108244	N/A	N/A
			Osteoblasto humano	N/A	N/A	7,05E+05	$\mu\text{m}^3$			BNID108245	N/A	N/A
Concentração crítica de oxigênio (hipoxia)	oxy_survival_limit	Numérica Contínua Número de agentes (moléculas) Parâmetro fixo	CHO	N/A	2,97E+04	N/A	moléculas/ $\mu\text{m}^3$	N/A	Considerando pressão atmosférica ao nível do mar (760 mmHg), condição de hipoxia na cultura de célula por $\text{PO}_2 = 5\%$ e constante de Henry = 771.65 mmHg/mM (para meio de cultura)	PLACE; DOMANN; CASE, 2017 AL-ANI <i>et al.</i> , 2018	2,97E-06	N/A
Limite inferior (crítico) de glicose	glc_lower_limit	Numérica Contínua Número de agentes (moléculas) Parâmetro fixo	CHO	N/A	4,68E-04	N/A	moléculas/ $\mu\text{m}^3/\text{célula}$	N/A	Considerando o PM da glicose = 180,16 g/mol e número de Avogadro = $6,022 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$	BAYRAK; WANG; CINAR; UNDEY, 2015 CID 5793	4,68E-14	N/A
Limite superior (crítico) de lactato	lac_high_limit	Numérica Contínua Número de agentes (moléculas) Parâmetro fixo	CHO	N/A	N/A	2,03E+07	moléculas/ $\mu\text{m}^3$	N/A	Considerando o PM do lactato = 89,07 g/mol e número de Avogadro = $6,022 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$	BAYRAK; WANG; CINAR; UNDEY, 2015 CID 91435	N/A	2,03E-03

Variável do modelo	Representação no programa	Classificação	Linhagem celular	Tipo de scaffold	Magnitude literatura (Min, Max)		Unidade	Variável de referência	Observação	Referências	Magnitude corrigida* (Min, Max)			
Iterador de ações celulares	n	<b>Númerica Discreta</b> <b>Dimensão temporal</b>	Queratinócitos e fibroblastos	Ausente	1,20E+02	3,36E+02					SUN et al., 2008	N/A	N/A	
			Co-cultura de células endoteliais, muscular, perivascular e intersticial	Ausente	9,60E+01	3,36E+02						PEIRCE; GIESON; SKALAK, 2004	N/A	N/A
			Populações de células com fenótipo de célula cancerígena	Ausente	9,60E+01	3,36E+02						YU; BAGHERI, 2020	N/A	N/A
			Condrócito suíno neonatal	Sem scaffold	N/A	2,40E+02	1 tick = 1 h	N/A	N/A			GILBERT; MOSHER; GOTTIPATI; ELDER, 2004	N/A	N/A
			Célula tronco mesenquimal derivada de medula óssea humana	Quitosana-Grafeno (obtido por liofilização)	N/A	3,36E+02						LOVECCHIO et al., 2019	N/A	N/A
			Fibroblasto dérmico humano	Integra (colágeno tipo 1) SmartMatrix (fibrina bovina/ alginato)	3,00E+00	2,40E+01						LEVIN; SHARMA; HOOK; GARCÍA-GARETA, 2019	N/A	N/A
			Fibroblasto dérmico humano	Hidrogel de fibrogênio e MEC	2,40E+01	3,60E+02						JORGENSEN <i>et al.</i> , 2020	N/A	N/A

Variável do modelo	Representação no programa	Classificação	Linhagem celular	Tipo de scaffold	Magnitude literatura (Min, Max)		Unidade	Variável de referência	Observação	Referências	Magnitude corrigida* (Min, Max)	
Energia de manutenção da célula	homeostasis_energy	Numérica Contínua Parâmetro fixo	Célula LS de camundongo	N/A	N/A	5,02E+11	ATP/célula/h	N/A	Considerando a energia de manutenção de células na fase estacionária (ligeiramente superior à energia requerida na fase exponencial de crescimento) e número de Avogadro = 6,022*10 <sup>23</sup> mol <sup>-1</sup>	KILBURN; LILLY; WEBB, 1969	N/A	N/A
Energia gasta no deslocamento celular	walking_energy	Numérica Contínua Parâmetro aleatório dentro do limite (min,max)	Queratinócito endotelia de peixe-dourado Fibroblasto de mamífero	N/A	1,83E+05	1,04E+06	ATP/célula	voxel_size	A velocidade de polimerização de F-Actina é aproximadamente igual à velocidade da célula. Portanto, a quantidade de ATP é proporcional ao comprimento do deslocamento. Foram considerados o número de filamentos de F-Actina por comprimento de lamelipódio e comprimento de lamelipódio de fibroblastos de mamíferos. Cálculo realizado conforme descrito por Flamholz, Phillips e Milo (2014)	FLAMHOLZ; PHILLIPS; MILO, 2014 BNID111061 BNID110741	N/A	N/A
Máxima energia acumulada por uma célula	maxenergy	Numérica Contínua Parâmetro fixo	Fibroblasto de camundongo	N/A	N/A	2,73E+13	ATP/célula	N/A	Estimativa considerando a energia de manutenção e de biossíntese	BNID101985	N/A	N/A
Energia inicial de uma célula	initenergy	Numérica Contínua Parâmetro fixo	Célula LS de camundongo	N/A	9,60E+12	N/A	ATP/célula	N/A	N/A	BNID101985	N/A	N/A

Variável do modelo	Representação no programa	Classificação	Linhagem celular	Tipo de scaffold	Magnitude literatura (Min, Max)		Unidade	Variável de referência	Observação	Referências	Magnitude corrigida* (Min, Max)	
Tempo de duplicação celular	td	Numérica Contínua Dimensão temporal Parâmetro variável	CHO iBMK cells Célula de fígado Célula tronco humana	N/A	21	72	h	n	N/A	BAYRAK; WANG; CINAR; UNDEY, 2015 BNID110686 BNID107375 BNID107993 BNID103762	N/A	N/A
Tempo da fase G1	tG1	Numérica Contínua Dimensão temporal Parâmetro aleatório dentro do limite (min,max)	CHO NCI-H292 NIH3T3	N/A	8	12	h	n	Relação baseada no tempo de duplicação de células CHO (24h)	BAYRAK; WANG; CINAR; UNDEY, 2015 BNID108481 BNID108482	N/A	N/A
Tempo da fase S	tS	Numérica Contínua Dimensão temporal Parâmetro aleatório dentro do limite (min,max)	CHO NCI-H292 NIH3T3	N/A	7	9	h	n	Relação baseada no tempo de duplicação de células CHO (24h)	BAYRAK; WANG; CINAR; UNDEY, 2015 BNID108486 BNID108484	N/A	N/A
Tempo da fase G2M	tG2M	Numérica Contínua Dimensão temporal Parâmetro aleatório dentro do limite (min,max)	CHO NCI-H292 NIH3T3	N/A	2	5	h	n	Relação baseada no tempo de duplicação de células CHO (24h)	BAYRAK; WANG; CINAR; UNDEY, 2015 BNID109223 BNID109224 BNID108480 BNID109222	N/A	N/A
Tempo máximo na fase de apoptose precoce	tEA	Numérica Contínua Dimensão temporal Parâmetro fixo	CHO Células de Rat Rattus norvegicus	N/A	$I'$	21	h	n	<sup>1</sup> Devido à grande amplitude entre o valor mínimo e máximo, foi adotado o valor mínimo (referente à células humanas) como parâmetro fixo	BAYRAK; WANG; CINAR; UNDEY, 2015 BNID112336	N/A	N/A

Variável do modelo	Representação no programa	Classificação	Linhagem celular	Tipo de scaffold	Magnitude literatura (Min, Max)		Unidade	Variável de referência	Observação	Referências	Magnitude corrigida* (Min, Max)	
Tempo máximo na fase de apoptose tardia	tLA	Numérica Contínua Dimensão temporal Parâmetro fixo	CHO Célula de fígado humano	N/A	3'	12	h	n	<sup>1</sup> Devido à grande amplitude entre o valor mínimo e máximo, foi adotado o valor mínimo (referente à células humanas) como parâmetro fixo	BAYRAK; WANG; CINAR; UNDEY, 2015 BNID104875	N/A	N/A
Largura do scaffold	scfx	Numérica Discreta Dimensão espacial Parâmetro fixo <sup>2</sup>	N/A	Hidrogel de fibrinogênio e MEC Integra (colágeno tipo 1) SmartMatrix (fibrina bovina/ alginato)	1,00E+02	4,80E+02	µm	voxel_size	<sup>2</sup> Foram utilizadas dimensões menores que as utilizadas em experimentos laboratoriais, como forma de redução do esforço computacional Valores da literatura: min 2000 µm, max 12000 µm	FREITAS; ALMEIDA; BARTOLO, 2014 JORGENSEN <i>et al.</i> , 2020 LEVIN; SHARMA; HOOK; GARCÍA-GARETA, 2018	N/A	N/A
Comprimento do scaffold	scfy	Numérica Discreta Dimensão espacial Parâmetro fixo <sup>2</sup>	N/A	Hidrogel de fibrogênio e MEC Integra (colágeno tipo 1) SmartMatrix (fibrina bovina/ alginato)	1,00E+02	4,80E+02	µm	voxel_size	<sup>2</sup> Foram utilizadas dimensões menores que as utilizadas em experimentos laboratoriais, como forma de redução do esforço computacional Valores da literatura: min 2000 µm, max 12000 µm	FREITAS; ALMEIDA; BARTOLO, 2015 JORGENSEN <i>et al.</i> , 2020 LEVIN; SHARMA; HOOK; GARCÍA-GARETA, 2018	N/A	N/A
Altura do scaffold	scfz	Numérica Discreta Dimensão espacial Parâmetro fixo <sup>2</sup>	N/A	Hidrogel de fibrogênio e MEC Integra (colágeno tipo 1) SmartMatrix (fibrina bovina/ alginato)	1,00E+02	4,80E+02	µm	voxel_size	<sup>2</sup> Foram utilizadas dimensões menores que as utilizadas em experimentos laboratoriais, como forma de redução do esforço computacional Valores da literatura: min 1000 µm, max 6000 µm	FREITAS; ALMEIDA; BARTOLO, 2016 JORGENSEN <i>et al.</i> , 2020 MEHRIAN; LAMBRECHTS; PAPANTONIOU; GERIS, 2020	N/A	N/A

Variável do modelo	Representação no programa	Classificação	Linhagem celular	Tipo de scaffold	Magnitude literatura (Min, Max)		Unidade	Variável de referência	Observação	Referências	Magnitude corrigida* (Min, Max)	
Porosidade desejada do scaffold	desiredpvoids <sup>3</sup>	Numérica Contínua Parâmetro variável	N/A	Diversos materiais e técnicas de fabricação para tecido ósseo e cartilaginoso	<b>0,60</b>	0,99	N/A	N/A	<sup>3</sup> Foi adotado como valor mínimo, a porosidade de 60%, baseado nos resultados obtidos na caracterização do <i>scaffold</i> , neste trabalho. O valor mínimo descrito na literatura é de 50%	TURNBULL <i>et al.</i> , 2018 WASYŁECZKO; SIKORSKA; CHWOJNOWSKI, 2020	N/A	N/A
Diâmetro do voxel	voxel_size	<b>Numérica Contínua Dimensão espacial Parâmetro variável</b>	N/A	<b>Cúbico</b>	<b>20</b>	<b>40</b>	<b>µm</b>	N/A	<b>Tamanho proposto baseado nos resultados obtidos na caracterização do scaffold no presente trabalho</b>	N/A	N/A	N/A
Volume do voxel	voxel_volume	Numérica Contínua Dimensão espacial Parâmetro variável de acordo com o diâmetro do voxel	N/A	Cúbico	8,00E+03	6,40E+04	µm <sup>3</sup>	voxel_size	N/A	N/A	N/A	N/A
Relação temporal de iteração entre a escala celular e molecular	n_to_seconds	Numérica Discreta Dimensão temporal Parâmetro fixo	N/A	N/A	N/A	60	min/h	n	N/A	N/A	N/A	N/A
Tempo de cultivo celular	runtime	Numérica Contínua Dimensão temporal Parâmetro fixo entre simulações comparadas	N/A	N/A	N/A	Valor máximo de <b>n</b>	h	n	Ver amplitude do parâmetro para diferentes cultivos de tecidos descritos na literatura na variável "Iterador de ações celulares"	N/A	N/A	N/A



Variável do modelo	Representação no programa	Classificação	Linhagem celular	Tipo de scaffold	Magnitude literatura (Min, Max)		Unidade	Variável de referência	Observação	Referências	Magnitude corrigida* (Min, Max)	
Concentração inicial de células	cinitcella	Numérica Contínua Parâmetro variável	Fibroblastos Fibroblasto dérmico humano Célula derivadas do perioste humano	Hidrogel de fibrogênio e MEC Integra (colágeno tipo 1) SmartMatrix (fibrina bovina/ alginato) Quitosana-Grafeno	2,11E-06	1,00E-05	célula/ $\mu\text{m}^3$	N/A	N/A	JORGENSEN et al., 2020 LEVIN; SHARMA; HOOK; GARCÍA-GARETA, 2019 LOVECCHIO <i>et al.</i> , 2019	N/A	N/A
Número inicial de células	ninitcella	<b>Numérica Discreta</b> <b>Número de agentes</b> <b>Parâmetro variável de acordo com tamanho do scaffold</b>	<b>Fibroblastos</b> <b>Fibroblasto dérmico humano</b>	N/A	<b>1</b>	<b>1096</b>	<b>células</b>	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Estágio do ciclo celular do inóculo	initstate	Textual Categórica Parâmetro aleatório dentro dos estados pre-definidos	Mamíferos - NE	N/A	G0, G1, S, G2M, EA, LA, A		N/A	N/A	N/A	BAYRAK; WANG; CINAR; UNDEY, 2015	N/A	N/A
Pressão parcial de oxigênio no gás injetado na cultura	Poxy	Numérica Contínua Parâmetro variável	N/A	N/A	38	140	mmHg	N/A	N/A	PLACE; DOMANN; CASE, 2017 AL-ANI <i>et al.</i> , 2018	N/A	N/A
Concentração de oxigênio no meio de cultura	initoxy_conc	Numérica Contínua Parâmetro variável de acordo com a pressão parcial de oxigênio	N/A	N/A	2,97E+04	1,09E+05	molécula/ $\mu\text{m}^3$	N/A	Considerando pressão atmosférica ao nível do mar (760 mmHg), condição de hipoxia na cultura de célula por $\text{PO}_2 = 5\%$ e constante de Henry = 771.65 mmHg/mM (para meio de cultura)	PLACE; DOMANN; CASE, 2017 AL-ANI <i>et al.</i> , 2018	N/A	N/A

Variável do modelo	Representação no programa	Classificação	Linhagem celular	Tipo de scaffold	Magnitude literatura (Min, Max)		Unidade	Variável de referência	Observação	Referências	Magnitude corrigida* (Min, Max)	
Número inicial de moléculas de oxigênio	ninitoxy	Numérica Discreta Número de agentes Parâmetro variável de acordo com a concentração de oxigênio	N/A	N/A	1,78E+10	1,20E+13	moléculas	ninitcella	Considerando o PM do oxigênio = 31,999 g/mol e número de Avogadro = $6,022 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$	N/A	1,78E+00	1,20E+03
Concentração inicial de glicose	cinitglc	Numérica Contínua Parâmetro variável	Fibroblastos	N/A	3,34E+06	1,50E+07	moléculas/ $\mu\text{m}^3$	N/A	N/A	JORGENSEN et al., 2020 THERMOFISHER SCIENTIFIC, 2021a CID 5793 LEVIN; SHARMA; HOOK; GARCÍA-GARETA, 2019 MERCK, 2021	N/A	N/A
Número inicial de moléculas de glicose	ninitglc	Numérica Discreta Número de agentes Parâmetro variável de acordo com a concentração de glicose	N/A	N/A	2,01E+12	1,65E+15	moléculas	ninitcella	Considerando o PM da glicose = 180,16 g/mol e número de Avogadro = $6,022 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$	N/A	2,01E+02	1,65E+05

Variável do modelo	Representação no programa	Classificação	Linhagem celular	Tipo de scaffold	Magnitude literatura (Min, Max)		Unidade	Variável de referência	Observação	Referências	Magnitude corrigida* (Min, Max)	
Taxa de alimentação de glicose <sup>4</sup>	Qglc	Numérica Discreta Número de agentes Parâmetro variável de acordo com a concentração de glicose	Condrócito suíno neonatal Célula tronco humana	Scaffold-free	1,18E+13	4,86E+16	molécula/min	ninitcella	Foi considerada a taxa de alimentação (mL/min) por unidade de volume do reator (mL) descrito pelos autores. <sup>4</sup> Esse valor foi multiplicado pela concentração de glicose em meio mínimo (1g/L) e volume do <i>scaffold</i> (do presente trabalho). Devido a limitações computacionais, o número de agentes do tipo glicose/ min foi reduzido para a ordem de grandeza máxima de 10 <sup>2</sup>	LOVECCHIO et al., 2019 MEHRIAN; LAMBRECHTS; PAPANTONIOU; GERIS, 2020	1,18E+03 Valor usado <sup>4</sup> : 1,18E+02	4,86E+06 Valor usado <sup>4</sup> : 4,86E+02
Taxa de alimentação de oxigênio <sup>5</sup>	Qoxy	Numérica Discreta Número de agentes Parâmetro variável de acordo com a concentração de oxigênio	N/A	N/A	1,05E+11	3,53E+14	molécula/min	ninitcella	Foi considerada a taxa de alimentação (mL/min) por unidade de volume do reator (mL) descrito pelos autores. Esse valor foi multiplicado pela concentração da molécula e volume do <i>scaffold</i> (do presente trabalho). <sup>5</sup> Devido a limitações computacionais, o número de agentes do tipo oxigênio/ min foi reduzido para a ordem de grandeza máxima de 10 <sup>2</sup>	LOVECCHIO et al., 2019 MEHRIAN; LAMBRECHTS; PAPANTONIOU; GERIS, 2020	1,05E+01	3,53E+04 Valor usado <sup>5</sup> : 3,53E+02
Tipo de cultivo	batch_mode	Textual Categorica	N/A	N/A	b, p		N/A	N/A	b = cultivo em modo batelada p = cultivo em modo perfusão	N/A	N/A	N/A

Variável do modelo	Representação no programa	Classificação	Linhagem celular	Tipo de scaffold	Magnitude literatura (Min, Max)		Unidade	Variável de referência	Observação	Referências	Magnitude corrigida* (Min, Max)	
Concentração de fatores de crescimento	cinitsig	Numérica Contínua Parâmetro variável <sup>6</sup>	NIH3T3	N/A	1,72E-05	8,60E-05	molécula/ $\mu\text{m}^3$	N/A	Na análise de principais fatores, foram utilizadas a concentração de 8,6 (max), valor 100 vezes maior que o descrito na literatura, devido ao volume do <i>scaffold</i> utilizado na análise de principais fatores. <sup>6</sup> Este parâmetro não foi considerado um fator, na análise.	ANTONIADES, 1981 DONATIS <i>et al.</i> , 2008	N/A	N/A
Número inicial de fatores de crescimento no meio	ninitcell	Numérica Discreta Número de agentes Parâmetro variável de acordo com a concentração de glicose	NIH3T3	N/A	1,03E+01	9,43E+03	moléculas	ninitcell	Caso o número de moléculas/min seja < 1, foi adotado ao menos 1 molécula por min.	N/A	N/A	N/A
Taxa de consumo de glicose	N/A	Numérica Contínua Valor de referência	CHO NOS Hibridoma camundongo-camundongo IV F1 1923	N/A	2,00E+05	2,01E+09	molecula/cell/min	ninitcell	N/A	PORTNER; BOHMANN; LUDEMANN; MAIRK, 1994 LÓPEZ-MEZA <i>et al.</i> , 2016 CID 5793	3,3300 7E-07	3,35E-03
Limite de ocupação do espaço vazio por MEC	ecm_threshold	Numérica Contínua Parâmetro variável	N/A	N/A	0,5	1,00	N/A	N/A	N/A	LU; TAKAI; WEAVER; WERB, 2011	N/A	N/A

\* A magnitude foi corrigida dividindo a magnitude original obtida da literatura pelo fator de redução ( $10^{10}$ ). A magnitude corrigida é o valor utilizado no programa desenvolvido (para fins de executabilidade computacional) e representa uma quantidade  $10^{10}$  maior no cenário real (experimental) descrito na literatura.

Fonte: Willer Ferreira da Silva Junior, 2021.