

MODELO COMPUTACIONAL PARA ANÁLISE DO DESENVOLVIMENTO DE CONSTRUÇÕES DE CARTILAGEM EM BIORREATOR

S. Cortez^{1*}, A. Completo² e J.L. Alves¹

¹ CMEMS, Universidade do Minho, Portugal; *scortez@dem.uminho.pt

² TEMA, Universidade de Aveiro, Portugal

PALAVRAS-CHAVE: Cartilagem, Engenharia de Tecidos, Método de Elementos Finitos

RESUMO: *As doenças degenerativas causam dor e perda de funcionalidade nas articulações. A engenharia de tecidos tem mostrado ser uma solução ideal para este tratamento, especialmente quando a degeneração severa ocorre. Nesta técnica de cultura é essencial controlar a troca e a quantidade adequada de nutrientes para células semeadas num hidrogel. Os modelos numéricos podem orientar estas experiências, ajudando a produzir materiais com propriedades biomecânicas otimizadas. Este trabalho visa apresentar um novo modelo de elementos finitos que permite analisar o transporte de solutos, a proliferação de condrócitos e a produção de matriz extracelular no interior da construção que ocorre em engenharia de tecidos da cartilagem articular.*

1 INTRODUÇÃO

Em engenharia de tecidos, o controlo do processo de cultura celular é crucial no desenvolvimento de tecidos com propriedades mecânicas homogéneas para a substituição de tecidos ou órgãos danificados.

Uma das principais dificuldades dos trabalhos experimentais é garantir a troca adequada da quantidade de nutrientes, como oxigénio e glicose, para todas as células semeadas no hidrogel, assim como preservar uma condição de cultivo otimizada e fornecer estimulação física através do uso de biorreatores [1].

A modelação matemática e a simulação computacional podem fornecer informações importantes sobre o processo de cultura, permitindo a seleção de condições de cultura que melhorem a qualidade dos tecidos desenvolvidos [2].

Este trabalho apresenta um modelo computacional capaz de fornecer uma visão significativa do processo de cultura celular

de hidrogéis semeados com condrócitos no interior de um biorreactor.

2 METODOLOGIA

2.1 MODELO DE ELEMENTOS FINITOS

Neste estudo um modelo matemático, baseado numa ferramenta computacional própria (V-Biomech) [3], foi desenvolvido para simular o crescimento de condrócitos e a produção de matriz extracelular numa construção porosa tridimensional. Este modelo 3D de elementos finitos é constituído por uma formulação de difusão e uma formulação mecânica totalmente acopladas, relacionando um modelo de *neo-Hookean* incompressível e equações constitutivas que descrevem transporte e a absorção de nutrientes, bem como o crescimento da matriz extracelular no interior da construção. O transporte destes nutrientes é regulado pela equação reação-difusão da lei de *Fick*:

$$\frac{\partial C^i}{\partial t} = \mathbf{D}^i \frac{\partial^2 C^i}{\partial x^2} - \mathbf{u}_m \frac{\partial C^i}{\partial x} + \dot{q}^i \quad (1)$$

onde C^i e \mathbf{D}^i é a concentração e o tensor difusividade do metabolito i , respetivamente. \mathbf{u}_m é o tensor velocidade de fluido e \dot{q}^i é o termo de absorção de nutrientes, calculado através da cinética de *Michaelis-Menten* [2, 4]:

$$\dot{q}^i = -\frac{V_{\max}^i C^i}{K_m^i + C^i} \rho_{cel} \quad (2)$$

A regulação do pH é linearmente dependente da concentração de lactato, que é dada pela seguinte equação:

$$\text{pH} = 7,4 - aC^{lact} \quad (3)$$

em que $a = 40600000$.

O crescimento celular no interior do hidrogel depende da migração das células por difusão, da proliferação (R_{prol}) e da sua morte (R_{death}), e segue a seguinte equação:

$$\frac{\partial \rho_{cell}}{\partial t} = \mathbf{D}_{cel} \frac{\partial^2 \rho_{cell}}{\partial x^2} + (R_{prol} - R_{death}) \rho_{cell} \quad (4)$$

onde ρ_{cell} é a densidade de condrócitos e \mathbf{D}_{cel} é o tensor difusividade das células no meio de cultura. A proliferação das células (R_{prol}) segue uma abordagem modificada da equação de *Monod-Contois* [5, 6] e, está associada ao efeito benéfico da tensão de corte (τ), gerada pelo fluxo de fluido no interior da construção. Esta influência pode ser descrita pela função modular, $g(|\tau|)$, dada por:

$$g(|\tau|) = \begin{cases} 0,6 + 4000000|\tau| & |\tau| \in [0, 0,1] \text{ Pa,} \\ 1 & |\tau| \in [0,1; 0,6] \text{ Pa,} \\ 2500000(0,000001 - |\tau|) & |\tau| \in [0,6; 1] \text{ Pa,} \\ 0 & |\tau| > 1 \text{ Pa,} \end{cases} \quad (5)$$

O fluxo de fluido deriva da lei de *Darcy* e é calculado através da seguinte equação:

$$\frac{\partial \mathbf{u}_m}{\partial x} = -\mathbf{K}_p \nabla p \quad (6)$$

\mathbf{K}_p é o tensor permeabilidade e ∇p o gradiente de pressão. Seguindo a relação de *Carman-Kozeny*, a permeabilidade do material é afetada pela variação da fração volúmica de fluido (n_f), dada por:

$$\mathbf{K}_p = \mathbf{K}_{p0} \frac{n_f^3}{(1 - n_f)^2} \quad (7)$$

Com o aumento da biomassa no hidrogel a permeabilidade atual vai diminuir relativamente à permeabilidade inicial (\mathbf{K}_{p0}). Para caracterizar este crescimento, a fração volúmica de fluido vai depender das respetivas frações volúmicas de material ao longo do tempo, como: a degradação do próprio hidrogel ($n_{hidrogel}$), as células ($n_{células}$), os glicosaminoglicanos (n_{GAGs}) e colagénio ($n_{colagénio}$). O crescimento de GAGs e colagénio segue a abordagem de [5].

A alteração da fração volúmica de fluido [7] na construção vai também afetar a difusividade do metabolito ao longo do tempo. Esta variação é governada pela equação *Mackie-Meares*, dada por:

$$\mathbf{D}^i = \left(\frac{n_f}{2 - n_f} \right)^2 \mathbf{D}_{medium}^i \quad (8)$$

2.2 PROPRIEDADES DO MATERIAL

Neste estudo, um quarto de um disco de hidrogel do tipo agarose 3% w/w com 8 mm de diâmetro e 5 mm de espessura foi modelado como material bifásico usando uma malha de 750 elementos hexaédricos de 27-nós. O hidrogel foi definido por um fluido incompressível e uma matriz sólida elástica compressível, com um módulo de corte de 0,00604 MPa e uma permeabilidade inicial de 5,0 mm⁴N⁻¹s⁻¹. O modelo 3D de elementos finitos foi inicialmente definido como estando submerso num meio de cultura do tipo DMEM (5% CO₂ e 37°C) e, as superfícies de topo e lateral estando em contacto com o

fluido, permitindo o transporte de nutrientes do meio para o interior do hidrogel. A superfície inferior do disco está verticalmente constrangida e a construção é simétrica ao longo do centro do disco. A densidade inicial de condrócitos foi de $60\,000\text{ cell/mm}^3$, considerando que estão embebidos e distribuídos na matriz do hidrogel de forma homogénea. As superfícies da construção em contacto com o meio de cultura apresentam uma concentração de fronteira de $2,05 \times 10^{-10}\text{ mol/mm}^3$, $2,20 \times 10^{-8}\text{ mol/mm}^3$ e $2,30 \times 10^{-9}\text{ mol/mm}^3$, para o oxigénio, glucose e lactato, respetivamente. As concentrações iniciais de oxigénio, glucose e lactato no interior do hidrogel foram de $2,05 \times 10^{-10}\text{ mol/mm}^3$, $5,10 \times 10^{-9}\text{ mol/mm}^3$ e $1,20 \times 10^{-9}\text{ mol/mm}^3$, respetivamente. O valor de pH inicial foi de 7,4 e os coeficientes de difusividade dos constituintes, entre outros parâmetros de transporte, estão definidos na Tab. 1.

Tab. 1 Parâmetros de material.

Parâmetro	Valor	Unidades
D_{meio}^{ox}	$2,10 \times 10^{-3}$	mm^2/s
D_{meio}^{gli}	$1,00 \times 10^{-3}$	mm^2/s
D_{meio}^{lact}	$1,40 \times 10^{-3}$	mm^2/s
D_{cel}	$1,70 \times 10^{-8}$	mm^2/s
K_m^{ox}	$6,00 \times 10^{-12}$	mol/mm^3
K_m^{gli}	$3,50 \times 10^{-10}$	mol/mm^3
V_{max}^{ox}	$1,18 \times 10^{-18}$	$\text{mol}/(\text{cell} \cdot \text{s})$
V_{max}^{gli}	$1,70 \times 10^{-17}$	$\text{mol}/(\text{cell} \cdot \text{s})$

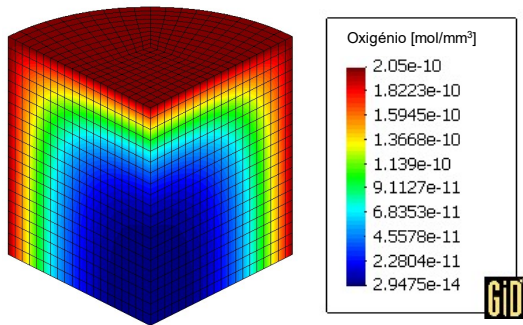
Neste estudo, duas simulações foram implementadas: (i) simulação do ambiente em biorreator de uma cultura em estado estacionário ao longo de 14 dias; (ii) simulação de uma cultura em biorreator com carregamento dinâmico de 10% de deformação compressiva a uma frequência de 1Hz, durante 1 hora. A influência da porosidade do hidrogel foi estudada definindo diferentes valores de porosidade inicial: 0,7, 0,75, 0,80, 0,85, 0,90 e 0,95. A influência da tensão de corte na cinética das

células foi analisada para o caso em que a porosidade é 0,8 e a densidade celular inicial de $60\,000\text{ cell/mm}^3$. A evolução no interior da construção das concentrações dos diferentes nutrientes e constituintes da matriz, bem como as propriedades mecânicas foi analisada.

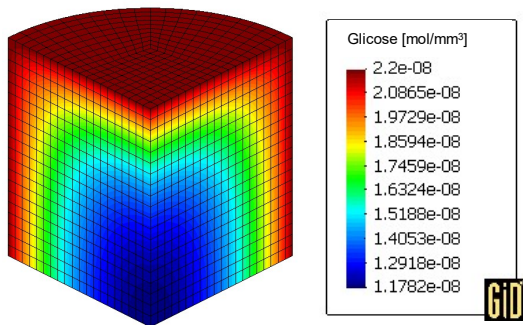
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo, foi desenvolvido um modelo computacional para a simulação do crescimento da matriz extracelular numa construção 3D porosa de agarose semeada com condrócitos e cultivada num biorreator. Numa primeira análise foi estudada a evolução espacial e temporal das concentrações locais médias de oxigénio, glucose e lactato, e a densidade de células no interior da construção (Fig.1). No final de duas semanas, verificou-se que a diminuição das concentrações de oxigénio e glucose, no interior da construção, são proporcionais ao consumo dos condrócitos (Fig.1 (a) e (b)). Na periferia é visível uma maior concentração de oxigénio e glucose do que no interior da construção. Como a concentração no meio (constantemente atualizada) é superior à concentração do interior da construção (consumida pelas células), o oxigénio e a glucose tendem a difundir do meio para o interior do material, até que atinjam um estado de equilíbrio. Consequentemente, a concentração de células vai ser maior, pois há maior quantidade de nutrientes, e neste caso, na periferia (Fig.1 (d)). Relativamente ao lactato, este é produzido pelas células e depende da concentração de oxigénio e glucose disponível no interior da construção. A quantidade de lactato, que inicialmente é nula no interior do hidrogel, aumenta ao longo do tempo, com o aumento da proliferação celular, tornando o interior do material mais ácido. Uma vez que a concentração de lactato no interior é superior, este metabolito tende a difundir do interior para o meio, verificando-se o

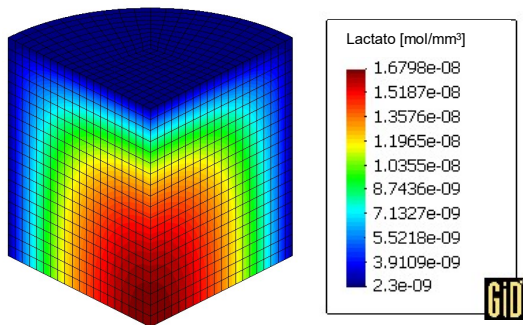
gradiente da concentração inverso (Fig.1 (c)).



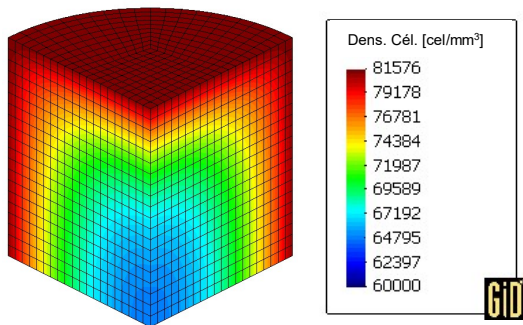
(a)



(b)



(c)



(d)

Fig. 1 Gradientes da concentração local de (a) oxigénio, (b) glicose, (c) lactato e (d) densidade celular no interior da amostra de tecido no final da simulação (t=14 dias).

Para analisar a influência da porosidade na evolução da construção, uma simulação da cultura em estado estacionário, definindo

diferentes porosidades (0,7, 0,75, 0,80, 0,85, 0,90 e 0,95) para o hidrogel, foi estudada por um período de cultura de 14 dias. Os resultados desta análise matemática revelam que a porosidade influencia a difusividade dos nutrientes, seguindo em concordância com a relação de *Mackie-Mears*. A densidade de condrócitos para diferentes porosidades da construção, calculada ao longo do tempo, é apresentada na Fig.2.

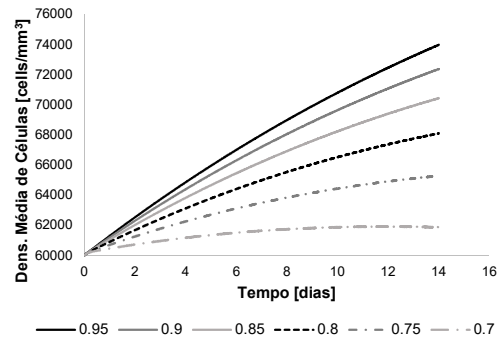


Fig. 2 Evolução da densidade média de condrócitos no interior do hidrogel com diferentes porosidades. Tempo de cultura de 14 dias

Verifica-se que a proliferação de células é maior nos casos de maior porosidade ($n_f=0,95$), onde a difusão é facilitada, permitindo uma maior quantidade de nutrientes disponível para as células. Com a acumulação de lactato no interior da estrutura porosa, o pH tende a diminuir ao longo do tempo (Fig.3).

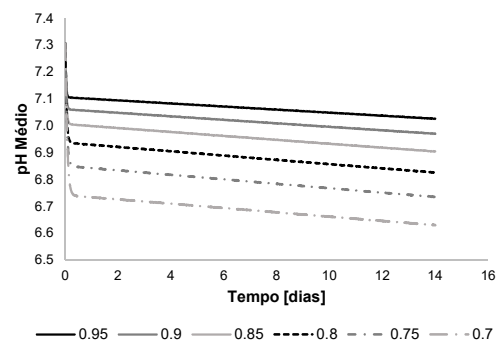


Fig. 3 Evolução do pH médio no interior do hidrogel com diferentes porosidades. Tempo de cultura de 14 dias.

Com uma menor porosidade ($n_f=0,7$), a difusão de lactato do interior para o

exterior do hidrogel torna-se mais dificultada, resultando num meio mais ácido, ou seja, com um valor de pH menor. A Fig.4 e a Fig.5 apresentam a evolução da quantidade de glicosaminoglicanos (GAGs) e colagénio, respetivamente, no interior do hidrogel. Verifica-se que a influência da porosidade só começa a ser visível próximo do 14º dia de simulação, onde a concentração total de GAGs é de aproximadamente 3.5 % (p/p). Este resultado pode estar associado à baixa difusividade dos GAGs no meio e aos parâmetros de crescimento baseados em [5].

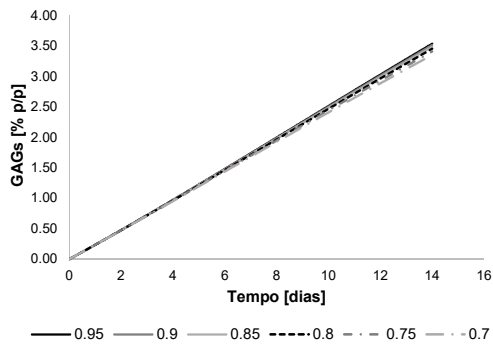


Fig. 4 Evolução da concentração média de GAGs no interior do hidrogel com diferentes porosidades. Tempo de cultura de 14 dias.

O mesmo não se verifica com a quantidade de colagénio presente na construção, em que após o tempo de simulação, a concentração variou com a porosidade inicialmente definida.

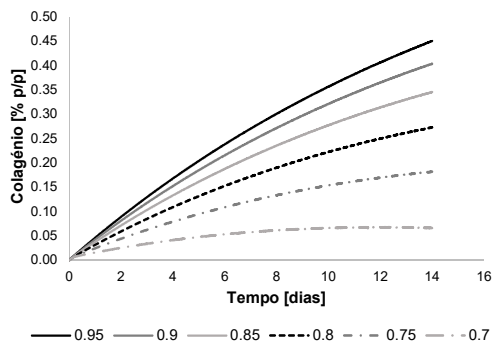


Fig. 5 Evolução da concentração média de colagénio no interior do hidrogel com diferentes porosidades. Tempo de cultura de 14 dias.

No entanto, esta variação está relacionada apenas com o aumento do número de

células no interior do hidrogel, uma vez que o colagénio não apresenta propriedades de difusão no meio de cultura devido à sua estrutura.

Analisando a evolução da permeabilidade do tecido ao longo do tempo de cultura (Fig.6), verifica-se que um aumento na densidade de células leva a uma diminuição da fracção volúmica de fluido e, conseqüentemente, a uma maior diminuição da permeabilidade. Como a proliferação de células é superior para a construção com maior porosidade ($n_f=0,95$), a diminuição da permeabilidade vai ser mais acentuada.

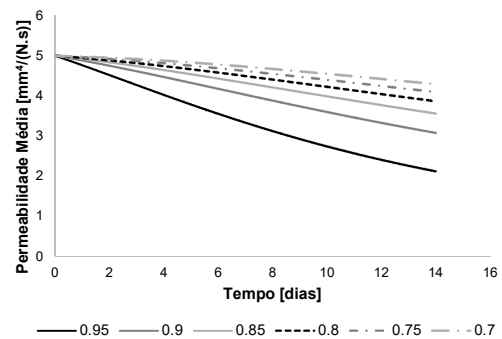


Fig.6 Evolução da permeabilidade média do hidrogel com diferentes porosidades. Tempo de cultura de 14 dias.

Com aumento da matriz extracelular, a fração volúmica de fluido diminui e a rigidez do material hiperelástico vai aumentar, ou seja, o módulo de corte vai tender para valores superiores ao inicialmente definido (0.00604 MPa) (Fig.7).

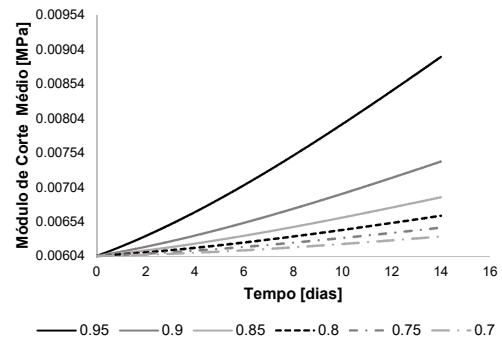


Fig.7 Evolução do módulo de corte médio do hidrogel com diferentes porosidades. Tempo de cultura de 14 dias.

No entanto, se a baixa porosidade pode estar associada ao atraso na proliferação celular devido à falta de nutrientes. Por outro lado, se os níveis da concentração de solutos forem elevados no interior da construção, o material implantável pode apresentar uma elevada permeabilidade e propriedades biomecânicas diferentes do tecido nativo.

Comparando o caso de cultura estacionária com o caso de cultura sob estímulo mecânico (Fig.8), verifica-se que a estimulação mecânica (10% de deformação a 1Hz durante 1 hora) teve uma influência positiva sobre proliferação celular. Apesar dos valores médios de tensão de corte no interior da construção porosa variarem entre 10^{-09} e 10^{-10} MPa, que se traduz num menor fator de proliferação, este aumento deve-se sobretudo à entrada de nutrientes no interior da construção, favorecendo o crescimento celular.

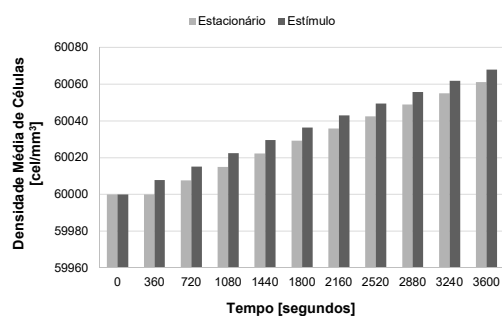


Fig.8 Densidade média de condrócitos no interior da construção ao fim de 1 hora de cultura em biorreator sob estado estacionário e sujeito a compressão cíclica compressiva (10% de deformação a 1Hz).

4 CONCLUSÃO

Em resumo, este trabalho analisou numericamente os efeitos da difusão e da compressão dinâmica no transporte de nutrientes e na proliferação celular no interior de um hidrogel. Construções com elevada porosidade mostraram promover o transporte e a entrada de oxigénio e glucose para o interior do hidrogel, bem como a proliferação celular, permitindo melhor propriedades mecânicas. O presente modelo numérico torna-se assim numa ferramenta útil para esclarecer estudos experimentais

sobre a viabilidade celular e o transporte de nutrientes no desenvolvimento de construções de engenharia de tecidos durante o processo de cultura em biorreator.

AGRADECIMENTOS

Sara Cortez agradece à Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT) pelo apoio financeiro no âmbito da bolsa SFRH/BD/87933/2012. Este trabalho é suportado pela FCT no âmbito dos projetos UID/EEA/04436/2013, PESt-C/EME/UI048 1/2013, FCOMP-01-0124-FEDER-015191, PTDC/EMSTEC/3263/2014, e pelo Programa Operacional Competitividade e Internacionalização através do projeto POCI-01-0145-FEDER-016574.



REFERÊNCIAS

- [1] L. Bian, et al. "Influence of decreasing nutrient path length on the development of engineered cartilage." *Osteoarthritis and Cartilage*, 17(5), 677-685, 2009.
- [2] B. G. Sengers, C. C. Van Donkelaar, C. W. J. Oomens and F. P. T. Baaijens, "Computational study of culture conditions and nutrient supply in cartilage tissue engineering." *Biotechnology Progress*, 21(4), 1252-1261, 2005.
- [3] J. L. Alves, et al., "Numerical simulation of musculo-skeletal systems by V-Biomech.", *Proceedings of CMBBE2010*, Valencia, Spain, 2010.
- [4] B. G. Sengers, C. W. Oomens and F. P. Baaijens, "An integrated finite-element approach to mechanics, transport and biosynthesis in tissue engineering.", *Journal of biomechanical engineering*, 126, 1, 82-91, 2004.
- [5] C. Bandejas, A. Completo and A. Ramos, "Influence of the scaffold geometry on the spatial and temporal evolution of the mechanical properties of tissue-engineered cartilage: insights from a mathematical model." *Biomechanics and modeling in mechanobiology*, 14(5), 1057-1070, 2015.
- [6] M. M. Nava, M. T. Raimondi and R. Pietrabissa, "A multiphysics 3D model of tissue growth under interstitial perfusion in a tissue-engineering bioreactor.", *Biomechanics and modeling in mechanobiology*, 12(6), 1169-1179, 2013.
- [7] R. Sacco, P. Causin, P. Zunino, and M. T. Raimondi, "A multiphysics/multiscale 2D numerical simulation of scaffold-based cartilage regeneration under interstitial perfusion in a bioreactor." *Biomechanics and modeling in mechanobiology*, 10(4), 577-589, 2011.