

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANDRÉ LUIZ DANIEL

MODELAGEM DE VARIÁVEIS BIOLÓGICAS NO REMODELAMENTO ÓSSEO

**CURITIBA
2010**

ANDRÉ LUIZ DANIEL

MODELAGEM DE VARIÁVEIS BIOLÓGICAS NO REMODELAMENTO ÓSSEO

Trabalho de conclusão de graduação
apresentada à disciplina Estágio II – Zoologia do
curso de Ciências Biológicas da Universidade
Federal do Paraná

Orientador: Prof. Dr. Márcio Pie
Orientadora Externa: Prof. Dra. Mildred Ballin
Hecke

**CURITIBA
2010**

RESUMO

O tecido ósseo é um sistema dinâmico capaz de promover reparos na sua estrutura devido a um conjunto de tipos celulares especializados que se comunicam através de proteínas e outras moléculas sinalizadoras. A simulação computacional deste tipo de sistema biológico é frequentemente realizada através do modelo matemático proposto por Volterra e Lotka, composto por um sistema de equações diferenciais e que foca no progresso temporal da população de uma certa entidade biológica, como populações animais ou celulares. No caso de estudos fisiológicos e teciduais, o conjunto de equações diferenciais indicam o tamanho das populações celulares e as concentrações das moléculas sinalizadoras. O trabalho aqui desenvolvido propõe uma atualização nos modelos elaborados previamente e encontrados na literatura sobre o remodelamento ósseo, baseados no modelo de Volterra-Lotka, focando principalmente na adição das variáveis responsáveis por estímulos físicos, como a esclerostina. A obtenção destas variáveis foi realizada através de uma revisão bibliográfica sobre novas descobertas adquiridas experimentalmente. O sistema foi estruturado por três tipos celulares, osteoblastos, osteoclastos e osteócitos, e cinco tipos de moléculas sinalizadoras, esclerostina, prostaglandina E2, S1P, RANKL e OPG. Após sua implementação, o sistema foi testado, sendo seu comportamento analisado por sua correspondência aos dados experimentais e aos resultados obtidos em outros modelos. Ao ser corroborado por estes dados, o sistema desenvolvido possibilita estudos mais avançados, incluindo diversas variáveis espaciais, como campo de tensões e migração celular.

Palavras-chave: Biologia óssea. Equações diferenciais. População celular. RANKL-OPG. Esclerostina. Sensibilidade biomecânica.

ABSTRACT

Bone tissue is a dynamic system capable of repairing its structure, based on certain cells lineages which communicate itself through proteins and others signaling molecules. The computational simulation of this kind of biological system is often based on the Volterra-Lotka mathematical model. This model relies on a set of differential equations which describes the size of a population and concentration of signaling molecules through time. The research here developed suggests an update on the models based on the Volterra-Lotka system prepared so far, inserting new variables regarded to mechanical sensibility of those systems. The selected variables were acquired by a literature revision, which provided new signaling molecules and behaviors that were never used on these dynamical models. The system itself was structured on a nonlinear dynamical system, composed of cells like osteoblasts, osteoclasts and osteocytes, and signaling molecules populations such as sclerostin, PGE2, S1P, RANKL and OPG. The validation of the system was performed, comparing it's results with experimental evidences and other researcher's models. As long as this new system is reliable, it can be upgraded to more advanced studies, adding several new variables, such as spatial ones, like tension fields of cellular migration.

Key words: Bone biology. Nonlinear dynamical systems. Cell populations. RANKL-OPG system. Sclerostin. Biomechanical sensing.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1. ANATOMIA ÓSSEA. JUNQUEIRA E CARNEIRO, ED. 10. 2004.	14
FIGURA 2 - ETAPAS DO REMODELAMENTO. MATSUO & IRIE, 2008.....	17
FIGURA 3 - ESTRUTURA DO BMU. IMAGEM EXTRAÍDA DE ROBLING <i>ET AL</i> , 2006.	19
FIGURA 4 - SIMULAÇÃO DO MODELO DE PRESA PREDADOR PROPOSTO POR VOLTERRA E LOTKA.....	25
FIGURA 5 - DEMONSTRAÇÃO DA FUNÇÃO DE HILL, DADA PELA CONCENTRAÇÃO DE UMA PROTEÍNA SINALIZADORA E SUA CAPACIDADE DE ALTERAR A ATIVIDADE BIOLÓGICA DE UMA CÉLULA. EM AZUL ATIVAÇÃO, EM VERMELHO REPRESSÃO.	29
FIGURA 6 - DINÂMICA DAS POPULAÇÕES CELULARES E CONCENTRAÇÕES DE PROTEÍNAS APÓS ALTERAÇÕES NA TENSÃO ÓSSEA. ESQUERDA, TENSÃO CORRESPONDENTE A 200% DA NORMAL. DIREITA, 5% DA NORMAL. SCL – ESCLEROSTINA.....	37
FIGURA 7 - PERTURBAÇÃO DA POPULAÇÃO DE CITOCINAS PGE2. AUMENTO DE 4 PONTOS À ESQUERDA DE REDUÇÃO DE 3 PONTOS À DIREITA.	39
FIGURA 8 - PERTURBAÇÃO NA CONCENTRAÇÃO DE S1P. À ESQUERDA AUMENTO DE APROXIMADAMENTE 3 PONTOS. À DIREITA REDUÇÃO DE 3 PONTOS.....	40
FIGURA 9 - CORRELAÇÃO ENTRE A RAZÃO RANKL/OPG E A VARIAÇÃO DA MASSA ÓSSEA.....	41
FIGURA 10 - ALTERAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE RANKL E OPG.À ESQUERDA, ADIÇÃO DE OPG, À DIREITA ADIÇÃO DE RANKL.	42
FIGURA 11 - COMPARAÇÃO QUALITATIVA ENTRE O MODELO PROPOSTO (ESQUERDA) E O DE PIVONKA, 2010 (DIREITA). ADIÇÃO DE OPG EM AMBOS OS CASOS. EM VERMELHO – OSTEOBLASTOS; AZUL – OSTEOCLASTOS. OBP E OBA – OSTEOBLASTOS PRECURSORES E ATIVOS RESPECTIVAMENTE; OCA – OSTEOCLASTOS ATIVOS.....	43
FIGURA 12 - PROGRESSO DAS POPULAÇÕES DA OSTEOCLASTOS E OSTEOBLASTOS, À ESQUERDA DO MODELO AQUI PROPOSTO E À DIREITA MALDONADO, 2006. EM VERMELHO – OSTEOBLASTOS; AZUL – OSTEOCLASTOS. XB – OSTEOBLASTOS; XC – OSTEOCLASTOS.....	44
FIGURA 13 - VARIAÇÃO DA MASSA ÓSSEA EM RELAÇÃO A RAZÃO ENTRE OSTEOBLASTOS E OSTEOCLASTOS.	46

FIGURA 14 - RELAÇÃO ENTRE CARGA E A RAZÃO OSTEOBLASTOS/OSTEOCLASTOS.....	47
FIGURA 15 - CORRELAÇÃO ENTRE CARGA E A TAXA DE VARIAÇÃO DA MASSA ÓSSEA.	47

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. PARÂMETROS UTILIZADOS NA SIMULAÇÃO DO MODELO DE REMODELAMENTO ÓSSEO.....	34
--	----

LISTA DE SÍMBOLOS

OB	- Osteoblastos
OCY	- Osteoclastos
OC	- Osteoclastos
<i>preOB</i>	- População de precursores de osteoblastos
βOB_1	- Taxa de diferenciação de Osteoblastos (PGE2)
βOB_2	- Taxa de proliferação de Osteoblastos (S1P)
βOC	- Taxa de diferenciação de Osteoclastos
βOCY	- Taxa de diferenciação de Osteócitos
σOB	- Taxa de apoptose de Osteoblastos
σOC	- Taxa de apoptose de Osteoclastos
σOCY	- Taxa de apoptose de Osteócitos
βSCL	- Taxa de síntese de Esclerostina
$\beta RANKL$	- Taxa de síntese de RANKL
βOPG_1	- Taxa de síntese de OPG por precursores
βOPG_2	- Taxa de síntese de OPG por osteoblastos
$\beta S1P$	- Taxa de síntese de S1P
$\beta PGE2$	- Taxa de síntese de PGE2
σSCL	- Taxa de degradação de Esclerostina
$\sigma RANKL$	- Taxa de degradação de RANKL
σOPG	- Taxa de degradação de OPG
$\sigma S1P$	- Taxa de degradação de S1P
$\sigma PGE2$	- Taxa de degradação de PGE2
$K_{scl,1}$	- Coeficiente de ativação de Esclerostina
$K_{scl,2}$	- Coeficiente de repressão de Esclerostina
K_{s1p}	- Coeficiente de ativação de S1P
K_{pge2}	- Coeficiente de ativação de PGE2 para proliferação de
K_{pge2}	- Coeficiente de ativação de PGE2 para produção de RANKL
$K_{RANKL-OPG}$	- Constante de associação entre RANKL e OPG
$K_{RANKL-RANK}$	- Constante de associação entre RANKL e RANK
K_{rankl}	- Coeficiente de ativação de RANKL
$\kappa Form$	- Taxa de formação de tecido ósseo por osteoblastos
$\kappa Reabs$	- Taxa de reabsorção de tecido ósseo por osteoclastos
RANK	- Concentração de RANK

$RANKL_{max}$	- Capacidade máxima de suporte para RANKL
$S1P_{max}$	- Capacidade máxima de suporte para S1P
$PGE2_{max}$	- Capacidade máxima de suporte para PGE2
SCL_{max}	- Capacidade máxima de suporte para Esclerostina
OPG_{max}	- Capacidade máxima de suporte para OPG
$\pi PGE2_{atv}$	- Função de Hill de ativação para PGE2
$\pi S1P_{atv}$	- Função de Hill de ativação para S1P
πSCL_{atv-OB}	- Função de Hill de ativação de osteoblastos para Esclerostina
$\pi SCL_{atv-OCY}$	- Função de Hill de ativação de osteócitos para Esclerostina
πSCL_{rep}	- Função de Hill de repressão para Esclerostina
$\pi RANKL_{atv}$	- Função de Hill de ativação para RANKL

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
1.1 OBJETIVOS.....	12
2 REVISÃO DA LITERATURA	12
2.1 ANATOMIA ÓSSEA.....	12
2.2 CÉLULAS COMPONENTES DO TECIDO.....	14
2.3. REMODELAMENTO.....	17
2.4 SISTEMA DE REGULAÇÃO.....	20
2.4.1. ESCLEROSTINA.....	20
2.4.2. PROSTAGLANDINA E2.....	22
2.4.3. EIXO RANK-RANKL-OPG	21
2.4.4. S1P	22
2.5. MODELOS MATEMÁTICAS	23
3. MATERIAIS E MÉTODOS	27
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	37
4.1. VALIDAÇÃO	37
4.2. ANÁLISE COMPARATIVA.....	43
4.3. RESULTADOS	45
5. CONCLUSÃO	48
6. REFERÊNCIAS	49

1. INTRODUÇÃO

O tecido ósseo é um sistema dinâmico capaz de adaptar sua estrutura física em resposta a estímulos. Neste processo, conhecido como remodelamento, forças mecânicas aplicadas aos ossos são capazes de alterar a taxa de reabsorção e deposição de material orgânico e inorgânico. O desuso de uma parte do corpo que está normalmente sobre alta tensão mecânica leva ao aumento da remoção do tecido nos ossos desta região e redução da deposição de material inorgânica e, assim, perda de densidade óssea. Já o uso acentuado, além de causar pequenos danos que estimulam o remodelamento, a deposição de tecido inorgânico é favorecido no remodelamento em comparação a remoção (Robling *et al*, 2006).

Vários estados patológicos podem levar à uma atividade anormal do remodelamento. Na osteoporose, resultado de uma desordem hormonal que acomete majoritariamente mulheres acima de quarenta anos e que ocupa a posição de um dos maiores problemas de saúde pública, a reabsorção de tecido se torna mais acentuada, o que diminui a densidade óssea e aumenta a probabilidade de fraturas (Melton *et al*, 1992). Do mesmo modo várias outras doenças como cânceres, artrite reumatóide e a doença de Paget, na qual há um aumento da atividade dos osteoclastos, o equilíbrio entre a deposição e extração de tecido é modificada, inclinando o remodelamento para a a reabsorção.

Como qualquer outro mecanismo biológico, o sistema ósseo possui complexidade elevada que o torna difícil de ser compreendido. Estas organizações complexas são definidas como sistemas com um número vasto de componentes caracterizados pelo alto grau de interconectividade e dependência (Higgins, 2002).

Neste contexto, a modelagem numérica e computacional auxilia na predição do desenvolvimento de tais sistemas não lineares (Ideker *et al*, 2006). Deste modo, o estudo matemático de fenômenos biológicos podem auxiliar na tomada de decisões quanto a novos direcionamentos de pesquisas e intervenções farmacológicas ou médicas.

1.1 OBJETIVOS

Este trabalho possui como objetivo propor a atualização de modelos matemáticos do remodelamento ósseo elaborados até o presente, adicionando novos componentes que representarão a resposta deste sistema aos estímulos mecânicos.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ANATOMIA ÓSSEA

Os ossos são órgãos com estruturas bem definidas e otimizadas para suportar fenômenos mecânicos. Um osso, de modo geral, é composto por três partes. A primeira é o perióstio, tecido fibroso e osteogênico localizado na parte mais lateral desse órgão. A segunda é o osso compacto intracortical, presente na região interna e que corresponde a maior parte do órgão. A terceira é o endóstio, que se encontra na porção mais medial e delimita a cavidade medular; é composto por uma fina camada de células osteogênicas, geradoras de osso (FIGURA 1).

A parte compacta intracortical ainda possui estruturas secundárias conhecidas como osteons ou sistema de Havers, que são colunas concêntricas dispostas longitudinalmente ao osso e está em remodelamento constante. O sistema de Havers abriga vasos sanguíneos longitudinais, enquanto os canais de Volkmann abrigam vasos sanguíneos transversais.

Em algumas regiões como nas epífises e metáfises (extremidades) a parte mais medial pode ser ocupada por osso trabecular, semelhante a uma esponja, com suas colunas alinhadas conforme o histórico de tensões exercida sobre esta determinada região (Tortora & Grabowski, 2006).

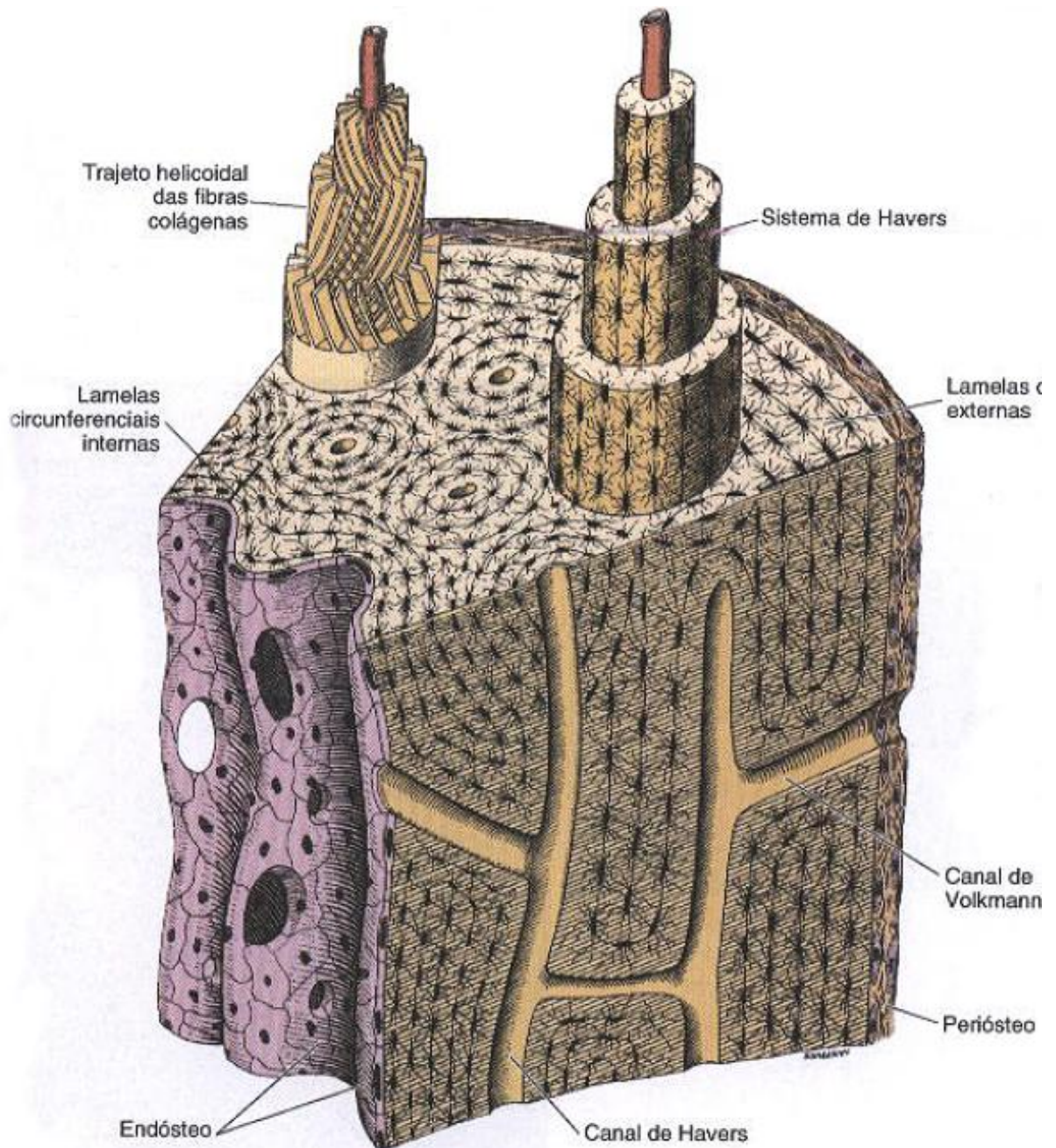


FIGURA 1. ANATOMIA ÓSSEA. JUNQUEIRA E CARNEIRO, ED. 10. 2004.

2.2 CÉLULAS COMPONENTES DO TECIDO

A formação e manutenção dessas estruturas requerem a atividade sincronizada de pelo menos três tipos celulares: osteoblastos, osteócitos e osteoclastos.

Os osteoblastos fazem parte da linhagem osteogênica (formadora de osso) originária de células tronco do tipo mesenquimal, as quais residem na medula óssea e são capazes de se diferenciarem em outros fenótipos além de osteoblastos, como mioblastos, condroblastos e fibroblastos (células musculares, de cartilagem e do tecido conjuntivo, respectivamente) (Caplain, 2005).

A atividade mais notável dos osteoblastos é síntese de uma matriz extracelular denominada osteóide que é composta em grande parte por colágeno tipo I, proteína amplamente encontrada em tecidos conectivos de animais e com função estrutural. Com a deposição do osteóide, os osteoblastos amadurecem e iniciam a expressão da enzima fosfatase alcalina, que possibilita a mineralização desta matriz orgânica em hidroxiapatita, mineral responsável pela rigidez óssea (Clarke, 2008; Robling *et al*, 2008). Após este processo o osso será composto de 50 a 70% de hidroxiapatita e de 20 a 40% de matriz orgânica, e mais alguns elementos em baixa porcentagem (Clarke, 2008).

Com a construção do osteóide e sua mineralização, uma parcela dos osteoblastos entra em apoptose¹ e outra parcela acaba encapsulada na própria matriz. Estes osteoblastos que estão alojados dentro do tecido começam a se diferenciar em osteócitos e ao mesmo tempo emitem longas extensões de suas membranas plasmáticas que chegam até os osteócitos adjacentes que também estão em desenvolvimento.

Os osteócitos e a rede formada por seus prolongamentos são correlacionados principalmente com a mecanotransdução, ou seja, identificação de tensões com subsequente tradução em respostas biológicas, dando início a fenômenos como o remodelamento (Robling *et al*, 2008).

¹ Morte celular programada.

Os osteoclastos são células multinucleadas (em média de 10 núcleos) (Jaworski *et al*, 1981) derivadas da fusão de células da linhagem monocítica-macrofágica. Monócitos são células do sistema imune que se desenvolvem na medula óssea e em seguida migram para a corrente sanguínea, onde possuem pouca atividade biológica. No entanto, quando estimuladas, invadem os tecidos onde são requisitados e se diferenciam em macrófagos. Estes macrófagos podem se tornar quiescentes ou desempenhar alguma função, como atacar um patógeno, e depois entrar em apoptose (Guyton & Hall, 2006).

A diferenciação de monócitos em osteoclastos é induzida por duas proteínas sinalizadoras conhecidas como RANKL e M-CSF, que são suficientes e necessárias para o amadurecimento deste tipo celular (Boyle *et al*, 2003). Ambas são sintetizadas por osteoblastos e inicialmente estimulam a fusão e migração das células precursoras (monócitos e macrófagos). Já o progresso a partir deste ponto, após a fusão até o amadurecimento completo, requer somente a presença de RANKL (Robling *et al*, 2006).

O osteoclasto maduro possui capacidade de reabsorver tecido ósseo. Inicialmente esta célula fixa suas extremidades no tecido através de integrinas (proteínas de contato e ancoragem celular) o que resulta em um microcompartimento entre a superfície inferior do osteoclasto e o tecido. Nesta região, a célula secreta íons de hidrogênio, que solubiliza o componente mineral, e as proteases, enzimas que degradam a matriz orgânica, promovendo assim a reabsorção (Robling *et al*, 2006).

2.3 REMODELAMENTO

Eventualmente, a exposição contínua do sistema ósseo a tensões pode causar pequenos danos que, caso não sejam reparados, se agravam a ponto de gerar fraturas. O remodelamento é um processo constante no tecido ósseo que envolve a reabsorção e deposição de pequenas parcelas do tecido e, de certa forma, recupera tais regiões danificadas (Robling *et al*, 2006).

Este processo é descrito como um ciclo que consiste de três etapas: (i) diferenciação de monócitos em osteoclastos, seguida do início da reabsorção que dura em torno de três semanas (Harada & Rodan, 2003). Com o progresso da reabsorção, os osteoclastos sinalizam a transição (ii), ou seja, a ativação de osteoblastos que iniciam a deposição de tecido ósseo e que se prolonga por pelo menos três meses (Matsuo & Irie, 2008; Harada & Rodan, 2003). E por fim, a formação do tecido é interrompida gradualmente até ser finalizado (iii).

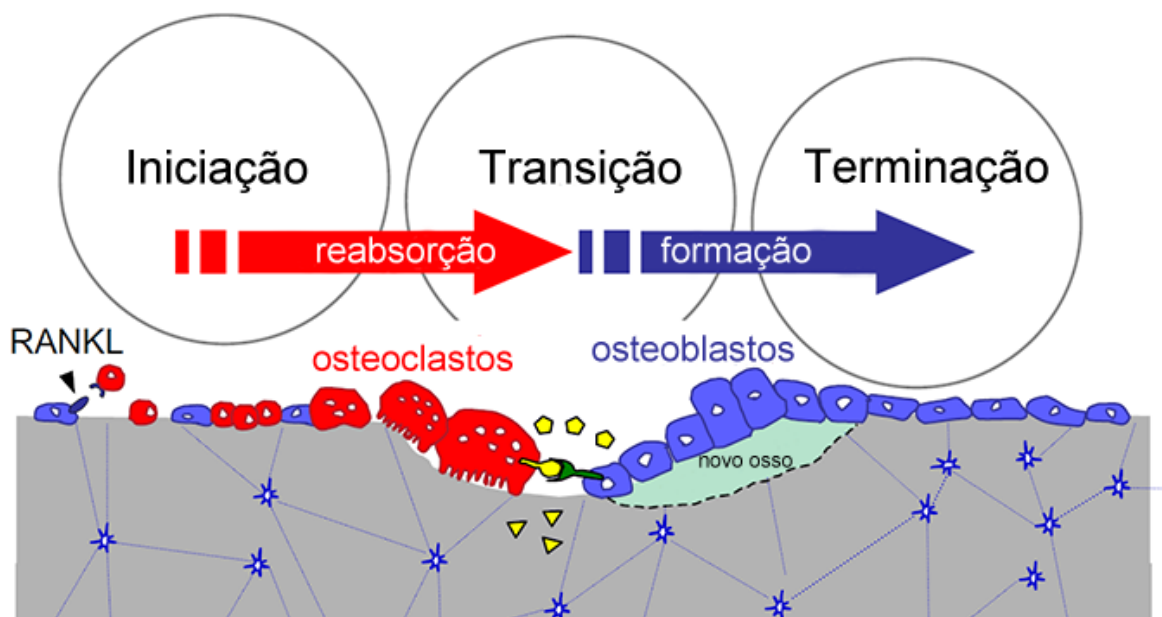


FIGURA 2 - ETAPAS DO REMODELAMENTO. MATSUO & IRIE, 2008.

Este acoplamento de osteoclastos e osteoblastos é chamado de unidade multicelular básica (*basic multicellular unit, BMU*) que, conforme vai se movendo através do tecido ósseo, forma um cone de substituição liderado pelos osteoclastos e seguido por osteoblastos (figura 3). Ao final do processo, nas regiões intracorticais, um novo ósteon será formado (Robling *et al*, 2006).

Sistemas biológicos, como o do remodelamento ósseo, possuem mecanismos de regulação intrínsecos, conhecidos como sistemas de retroalimentação (*feedback*).

A retroalimentação negativa envolve uma entidade biológica que reconhece um estado qualquer e responde de modo a inibir o progresso desta situação. Por exemplo, com a redução da tensão normal em uma determinada região de um osso hipotético, a taxa de remodelamento aumenta, favorecendo a reabsorção de tecido. Com o progresso deste fenômeno, a tensão começa a se elevar devido a retirada do tecido que não promove mais a resistência mecânica. Com isso, um sistema de sinalização é deflagrado e reverte o remodelamento de um estado de remoção de tecido para deposição, até que o sistema entre em equilíbrio novamente. Caso contrário, o tecido seria reabsorvido por inteiro.

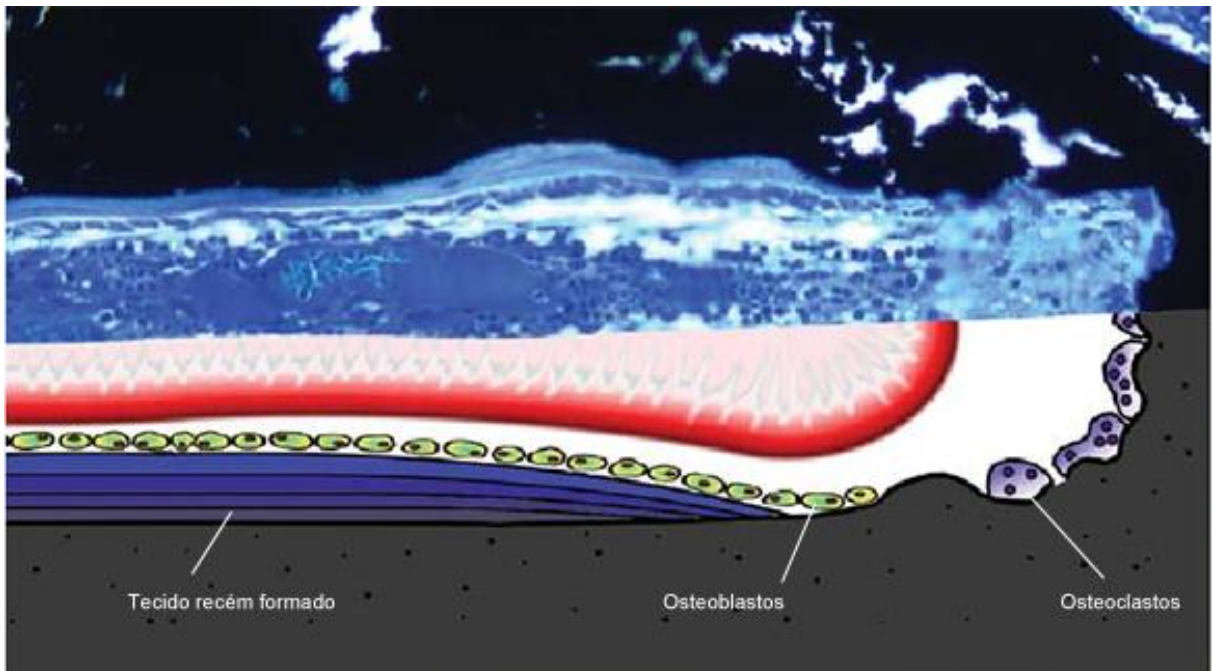


FIGURA 3 - ESTRUTURA DO BMU. IMAGEM EXTRAÍDA DE ROBLING *ET AL*, 2006.

Na retroalimentação positiva a resposta amplifica um determinado sinal. Durante o remodelamento, a comunicação entre osteoblastos e osteoclastos é aumentada. Os osteoblastos sintetizam uma proteína chamada RANKL, que estimula a proliferação de osteoclastos. Já os osteoclastos secretam a S1P, que aumenta a reprodução de osteoblastos. Com isso, há a formação de um círculo vicioso que aumenta a taxa de reabsorção e formação óssea em uma unidade de área.

Os componentes da regulação do sistema ósseo serão listados abaixo.

2.4 SISTEMA DE REGULAÇÃO

2.4.1 ESCLEROSTINA

A esclerostina é um antagonista do receptor presente em osteoblastos conhecido como LRP5/6. Tal receptor é integrante da via de sinalização Wnt/ β -Catenina e que influencia a diferenciação, proliferação e atividade de osteoblastos (Shahnazari *et al*, 2008). Desta forma esta proteína, ao se ligar ao seu receptor, pode causar a apoptose e diminuição da atividade celular de osteoblastos (Sutherland *et al*, 2004).

A síndrome de Van Buchem é uma desordem que acomete o sistema ósseo e que leva ao aumento excessivo de sua massa. Esta doença está correlacionada com uma mutação no gene SOST, codificador da proteína esclerostina e expresso somente em osteócitos (Robling *et al*, 2008).

Posteriormente a descoberta da causa da síndrome de Van Buchem, vários estudos demonstraram que a esclerostina é modulada pela intensidade de carga aplicada ao tecido ósseo. Quando submetido a uma tensão elevada, os osteócitos inibem a produção de esclerostina. De forma análoga, a redução da tensão provoca o aumento da síntese desta proteína (Robling *et al*, 2006; Lin *et al*, 2009; Gaudio *et al*, 2010).

Além disso, a esclerostina parece ser fundamental para a sensibilidade do tecido à tensão já que em modelos animais a deleção do gene SOST impede o processo de remodelamento, além de causar um quadro de osteopetrosis² (Lin *et al*, 2009).

² Aumento excessivo da massa óssea.

2.4.2 EIXO RANK-RANKL-OPG

A comunicação entre osteoblastos e osteoclastos é tão necessária quanto a esclerostina e o PGE2 para o início do remodelamento. A reabsorção óssea pelos osteoclastos, como comentado anteriormente, requer a presença de duas moléculas sinalizadoras produzidas por osteoblastos: M-CSF (fator estimulador de colônia de macrófagos) e RANKL (ligante do receptor RANK) (Boyce & Xing, 2007; Boyle *et al*, 2003). Entretanto, os osteoblastos também podem sintetizar uma terceira proteína chamada osteoprotegerina (OPG) que atua como um falso receptor para RANKL, diminuindo sua concentração efetiva e conseqüentemente a diferenciação de osteoclastos (Clarke, 2008; Matsuo & Irie, 2008).

O balanço da síntese entre RANKL e OPG depende do contexto e dos sinais que estas células recebem. Por exemplo, a regulação do cálcio plasmático pelo paratormônio (PTH) é dada por sua capacidade de inibir a expressão de OPG e induzir a de RANKL em osteoblastos, assim, aumentando reabsorção de cálcio nos ossos por osteoclastos (Huang *et al*, 2004). De fato, grande parte das proteínas sinalizadoras, como TNF- α , IL-1, IL-11, hormônio da tireóide, vitamina D3 e PGE2, que interferem no metabolismo ósseo agem através desse eixo, conceito denominado de teoria da convergência (Silvestrini *et al*, 2005).

2.4.3 PROSTAGLANDINA E2

Prostaglandinas são lipídios biologicamente ativos pertencentes ao grupo dos eicosanóides e originados através da conversão do ácido araquidônico pela enzima

ciclooxigenase (COX). Estes lipídios podem controlar diversos mecanismos no sistema cardiovascular, renal, gastrointestinal, ósseo, entre outros (Miller, 2006).

No remodelamento ósseo, a prostaglandina mais comum é a prostaglandina E2 (PGE2) que possui efeito duplo, podendo tanto estimular a reabsorção quanto a formação óssea, dependendo da continuidade e tempo da administração deste composto. Esta capacidade de reabsorção do tecido induzida pela PGE2 é considerada como um efeito indireto, que ocorre através da regulação positiva da produção do ligante do receptor RANK (RANKL) e inibição da osteoprotegerina (OPG) em osteoblastos (descritos adiante), enquanto a parte osteogênica está correlacionada ao aumento da diferenciação de precursores em osteoblastos (Blackwell *et al*, 2010).

Além destas características, a PGE2 se assemelha a esclerostina por ser sintetizada por osteócitos e por ser expressa conforme estimulação mecânica (Burguer *et al*, 1999). Sendo assim, ambas são sintetizadas como forma de controle da reabsorção e formação óssea.

2.4.4 S1P

Na fase de transição do remodelamento (FIGURA 2), sinais gerados por osteoclastos após a reabsorção estimulam tanto a diferenciação de osteoblastos quanto a deposição de osteóide. Deste modo, o acoplamento entre os osteoblastos e osteoclastos, que permite a formação do BMU, possibilita que os osteoclastos indiquem aos osteoblastos onde ocorreu a reabsorção óssea e quantidade de volume removido, permitindo uma resposta adequada de deposição do tecido.

Enquanto a indicação do local onde ocorreu a reabsorção óssea raramente é alterada, o equilíbrio entre o volume de tecido removido e adicionado pode variar amplamente como, por exemplo, na osteoporose (Robling *et al*, 2006).

Um destes fatores de acoplamento entre osteoclastos e osteoblastos é a proteína secretada por osteoclastos denominada S1P, que possui duplo comportamento no contexto do remodelamento ósseo. Inicialmente, a S1P é produzida em resposta ao estímulo por RANKL, e resulta na inibição da osteoclastogenesis. Por outro lado, a proteína S1P induz a produção de PGE₂ por osteoblastos, que é um conhecido indutor de RANKL. Deste modo, a produção de S1P por osteoclastos e RANKL por osteoblastos gera uma retroalimentação positiva. Além disso, S1P demonstrou capacidade quimiotátil (atração, migratória) para osteoblastos, aumentando o tamanho da população destas células na região onde há secreção de S1P (Ryu *et al*, 2006).

2.4 MODELOS MATEMÁTICOS

Devido a complexidade e dificuldade na análise intuitiva dos sistemas biológicos, o desenvolvimento de modelos matemáticos pode auxiliar na compreensão do comportamento destes sistemas. A abordagem freqüentemente empregada neste tipo de estudo é o de sistemas dinâmicos baseados em equações diferenciais ordinárias, tendo como vantagem a acessível interpretação dos dados baseados no progresso das variáveis do sistema ao longo do tempo (Moroz *et al*, 2006).

Estes modelos são semelhantes ao elaborado por Volterra e Lotka para resolver a dinâmica populacional de peixes no mar Adriático. Supondo que $N(t)$ indica o número de presas e $P(t)$ são predadores:

$$\frac{dN}{dt} = Na - bNP \quad (2.1)$$

$$\frac{dP}{dt} = cNP - dP \quad (2.2)$$

Onde a , b , c e d são constantes positivas que determinam a taxa de nascimento de presas, taxa de sucesso da caça por predadores, taxa de nascimento de predadores e taxa de morte de predadores, respectivamente. O gráfico do progresso deste modelo pode ser visto na figura 4.

A característica mais sobressalente deste sistema é a não linearidade. Nos sistemas lineares, a resultante total sempre será a soma das resultantes de cada componente. De outra maneira, isto quer dizer que os efeitos observados são ligados as causas correspondentes por um conjunto de leis que a reduzem à simples proporcionalidade.

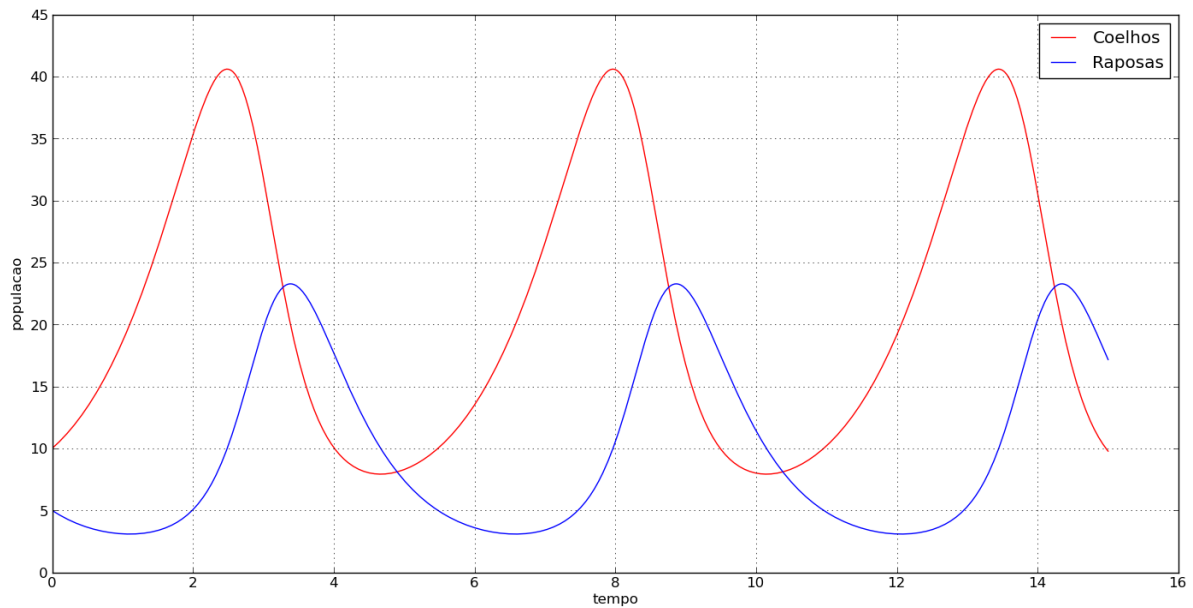


FIGURA 4 - SIMULAÇÃO DO MODELO DE PRESA PREDADOR PROPOSTO POR VOLTERRA E LOTKA.

Por outro lado, nos sistemas não lineares a resultante da ação combinada de elementos pode derivar respostas muitas vezes inesperadas, o que reflete a cooperatividade entre estas entidades. Assim, o surgimento de padrões, eventos e transições depende dos estados iniciais e de como o sistema evoluiu no espaço e no tempo, característica conhecida como caos determinístico (Nicolis, 1995).

É esta peculiaridade que o sistema na figura 4 demonstra. A forma como a população de raposas evoluirá depende do estado em que a de coelhos se encontra, e vice versa. Variações nas taxas de reprodução de cada um, sucesso na caça e outros parâmetros alteraram significativamente o progresso do sistema.

Nos modelos de populações celulares a diferença mais visível está nos componentes intermediários, ou seja, as moléculas sinalizadoras. Assim, para que uma célula influencie a outra, não somente o tamanho da população como também a concentração destes sinalizadores deve ser variada.

Vários modelos para o remodelamento ósseo foram propostos nos últimos anos. Komarova *et al* publicaram um modelo estruturado em equações diferenciais que representou a densidade da população de osteoclastos, osteoblastos e suas interações por comunicações parácrinas³ de OPG, RANKL, TGF- β e IGF. O modelo descreve tanto remodelamento iniciado por alguma perturbação ou por aleatoriedade, além de uma correlação com a síndrome de Paget, caracterizada pelo aumento da atividade dos osteoclastos, e da resposta gerada pelo hormônio da paratireóide (Komarova *et al*; 2003; Komarova, 2005). De modo semelhante, Lemaire *et al* desenvolveram um modelo que reproduziu algumas doenças que são comuns no sistema ósseo como deficiência de estrógeno e vitamina D (Lemaire, 2004).

No entanto, estes modelos representam somente aspectos temporais. Em 2009, uma perspectiva espaço-temporal adveio com o trabalho de Ryser *et al*, focando no progresso espacial do BMU guiado pela estimulação de RANKL e refinado por OPG, porém, sem considerar sua formação e finalização (Ryser *et al*, 2009).

A estimulação mecânica foi inserida por Maldonado (Maldonado *et al*, 2006). No modelo, que utiliza comunicação entre osteoblastos e osteoclastos semelhante aos modelos prévios, a mecanotransdução é mediada por osteócitos através do óxido nítrico e PGE2.

³ Comunicação entre células adjacentes através de moléculas sinalizadoras.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

O modelo matemática aqui estudado utiliza um sistema de equações diferenciais não lineares semelhante ao proposto por Pivonka (Pivonka *et al*, 2008). O modelo é baseado na variação das populações de células osteoblásticas, osteoclásticas e osteocíticas, além das proteínas sinalizadoras esclerostina, PGE2, RANKL, OPG e S1P.

As variações nas populações de cada grupo são estritamente temporais, ou seja, é considerado que a região ocupada por estes elementos (células e proteínas) possui volume mínimo suficiente para abrigar e manter a população celular assumida como condição inicial (TABELA 1, OB_{ini} , OCY_{ini} , OC_{ini} , respectivamente tamanho da população de osteoblastos osteócitos e osteoclastos inicial) e qualquer tamanho que a população possa atingir, além de permitir as interações celulares. As concentrações das moléculas sinalizadoras e a população celular são, então, consideradas como médias para esse volume mínimo. Com isso, os padrões espaciais, como a formação do BMU, são omitidos.

A influência que uma célula exerce em outra é mediada pelas proteínas sinalizadoras. Quando o sistema está em equilíbrio, uma perturbação na produção de uma destas proteínas ou no tamanho da população de uma célula altera o estado das demais.

A taxa de variação destas populações celulares é caracterizada por fatores intrínsecos como a taxa de diferenciação celular (indicado por β , por exemplo β_{OB} para taxa de diferenciação de osteoblastos), a taxa de apoptose/morte (indicado por

σ , como σ_{OC} para osteoclastos), que são proporcionais a quantidade de células existentes.

O controle da diferenciação e da apoptose é regido pelas moléculas sinalizadoras. No entanto, o estímulo ou repressão depende das suas concentrações, ou seja, a variação da concentração destas proteínas nem sempre resulta numa mudança do comportamento das células de modo proporcional, existindo uma faixa de concentrações onde a variação induz uma mudança maior e outras onde a influência é indiferente (FIGURA 5). A representação deste comportamento é realizado pelas funções de Hill (EQUAÇÃO 3.5, 3.6), amplamente usadas no modelo de cinética bioquímica (Rosenfeld, 2005; Pivonka, 2008).

As equações de variação das populações celulares e do volume ósseo são dadas abaixo,

$$\begin{aligned} \frac{dOB}{dt} = & \pi PGE2_{atv} \times \beta OB_1 \times preOB + OB \times (\pi S1P_{atv} \times \beta OB_2 - \beta OCY \times \kappa Form \\ & \times \pi SCL_{rep} - \pi SCL_{atv-OB} \times \sigma OB) \end{aligned} \quad (3.1)$$

$$\frac{dOC}{dt} = \beta OC \times \pi RANKL_{atv} - \sigma OC \times OC \quad (3.2)$$

$$\frac{dOCY}{dt} = \beta OCY \times \kappa Form \times \pi SCL_{rep} \times OB - \pi SCL_{atv-OCY} \times \sigma OCY \times \kappa Reabs \times OC \quad (3.3)$$

$$\frac{dVOL}{dt} = \kappa Form \times \pi SCL_{rep} \times OB - \kappa Reabs \times OC \quad (3.4)$$

onde as funções indicadas pelo símbolo π representam as funções de Hill para uma molécula sinalizadora M qualquer, sendo X a concentração desta molécula e K_i o coeficiente de regulação. O índice atv indica ativação e rep repressão,

$$\pi M_{atv} = \frac{X}{K_1 + X} \quad (3.5)$$

$$\pi M_{rep} = \frac{1}{1 + X/K_2} \quad (3.6)$$

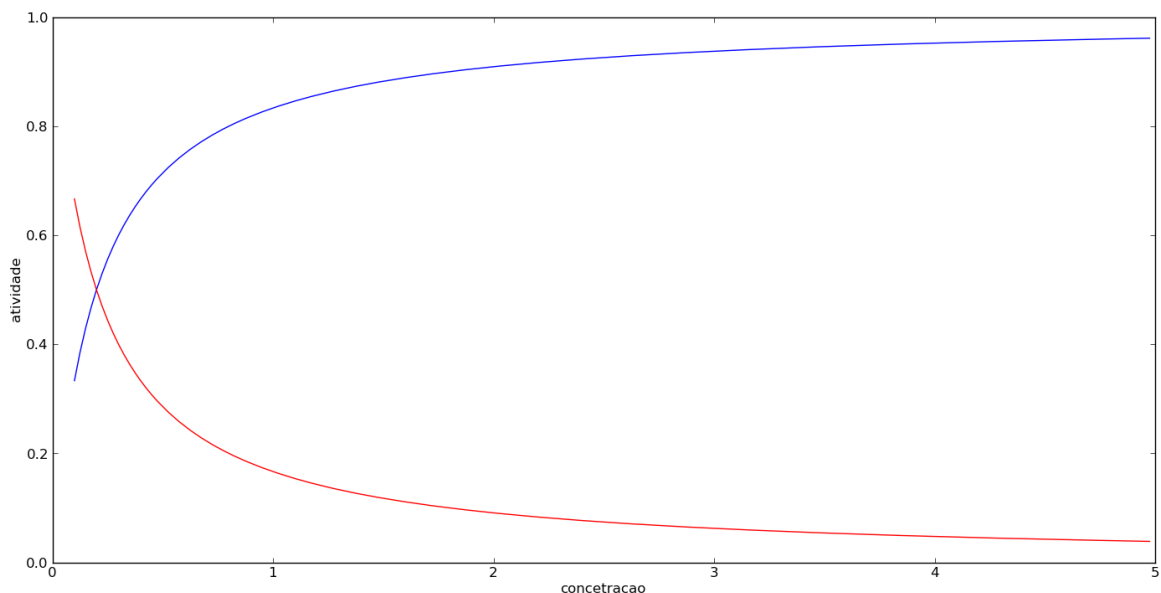


FIGURA 5 - DEMONSTRAÇÃO DA FUNÇÃO DE HILL, DADA PELA CONCENTRAÇÃO DE UMA PROTEÍNA SINALIZADORA E SUA CAPACIDADE DE ALTERAR A ATIVIDADE BIOLÓGICA DE UMA CÉLULA. EM AZUL ATIVAÇÃO, EM VERMELHO REPRESSÃO.

Três proteínas interferem na diferenciação e proliferação de osteoblastos (OB) através da função de Hill. A PGE_2 , atua principalmente estimulando os precursores ($preOB$) que, para fins de simplicidade, serão considerados como uma população constante. A molécula sinalizadora é a $S1P$, que estimula osteoblastos já adultos. A esclerostina (SCL) estimula a morte destas células, além de reprimir sua conversão em osteócitos e a formação de tecido ósseo.

Já os osteoclastos (OC) são controlados unicamente pela presença de *RANKL*, além das capacidades naturais de diferenciação e apoptose. Já a formação de osteócitos (OCY) depende amplamente da formação e reabsorção de volume ósseo, além disso, a esclerostina tanto reduz a capacidade de formação quanto aumenta a morte destas células.

O volume ósseo é dado pela capacidade natural de cada osteoblasto de formar ($\kappa Form$) e de osteoclastos de retirar $\kappa Reabs$ tecido. Salientando que a esclerostina possui capacidade de reduzir a deposição óssea.

Para representar a variação da concentração destas proteínas, não seria apropriado utilizar equações diferenciais e por isso é necessário utilizar outra abordagem. Como as proteínas entram em estado de equilíbrio em tempo muito menor que os tipos celulares, ou seja, é muito mais rápido produzir uma proteína do que uma célula se diferenciar ou entrar em apoptose, se utiliza equações em estado de quase equilíbrio, dada pela resolução analítica de cada equação diferencial:

Seja A a concentração de uma molécula sinalizadora,

$$\frac{dA}{dt} = \beta A \times \pi i \left(1 - \frac{A}{A_{max}}\right) + A_{externo} - \sigma A \quad (3.7)$$

onde βA é a taxa de produção da proteína, σA sua destruição, A_{max} sua capacidade máxima no tecido e πi uma outra proteína qualquer que a influencia e $A_{externo}$ a administração externa, então,

$$A = \frac{\beta A \times \pi i + A_{externo}}{\frac{\beta A \times \pi i}{A_{max}} + \sigma A} \quad (3.8)$$

Deste modo, para a esclerostina temos:

$$SCL = \frac{\beta SCL \times \pi Tensao_{rep} \times OCY + SCL_{ext}}{\frac{\beta SCL \times \pi Tensao_{rep} \times OCY}{SCL_{max}} + \sigma SCL} \quad (3.9)$$

Onde $\pi Tensao_{rep}$ é o valor de que indica a repressão derivada perturbação da carga aplicada ao tecido, sendo 1 o valor normal. Assume-se que estas variações são semelhantes a função de Hill para a de síntese de SCL e PGE2.

$$PGE2 = \frac{\beta PGE2 \times \pi Tensap_{atv} \times OCY + PGE2_{ext}}{\frac{\beta PGE2 \times \pi Tensap_{atv} \times OCY}{PGE2_{max}} + \sigma PGE2} \quad (3.10)$$

$$S1P = \frac{\beta S1P \times \pi RANKL_{atv} \times OC + S1P_{ext}}{\frac{\beta S1P \times \pi RANKL_{atv} \times OC}{S1P_{max}} + \sigma S1P} \quad (3.11)$$

Para o OPG, se deve levar em conta que tanto osteoblastos maduros como percusores o produzem.

$$OPG = \frac{\beta OPG_1 \times OB + \beta OPG_2 \times preOB + OPG_{ext}}{\frac{\beta OPG_1 \times OB + \beta OPG_2 \times preOB}{OPG_{max}} + \sigma OPG} \quad (3.12)$$

Já para o RANKL, também deve ser considerado a sua produção por ambos os tipos celulares, por outro lado, sua capacidade máxima também é dita por estas células, já que é uma proteína ligada a membrana plasmática destas células.

$$RANKL_{max} = (R_1^{RANKL} \times OB + R_2^{RANKL} \times preOB) \times \pi PGE2 \quad (3.13)$$

Além disso, a concentração total de RANKL em um determinado momento é a soma de RANKL livre e suas formas complexadas com OPG e RANK.

$$RANKL_{total} = RANKL + RANKL \cdot OPG + RANKL \cdot RANK \quad (3.14)$$

$$RANKL_{total} = RANKL \times (1 + K_{RANKL-OPG} \times OPG + K_{RANKL-RANK} \times RANK) \quad (3.15)$$

Sendo K_i as constantes de associação de RANKL com OPG e RANK. Portanto,

$$\begin{aligned} \frac{dRANKL}{dt} = & \beta RANKL \times \left(1 - \frac{RANKL_{total}}{RANKL_{max}} \right) - \sigma RANKL \times RANKL_{total} \\ & + RANKL_{ext} \end{aligned} \quad (3.16)$$

$$RANKL = \frac{RANKL_{max}}{(1 + K_1 \times OPG + K_2 \times RANK)} \times \left(\frac{\beta RANKL + RANKL_{ext}}{\beta RANKL + \sigma RANKL} \right) \quad (3.17)$$

Como explanado anteriormente (PAG, as funções πM_{atv} ou rep (de Hill) são dadas por

$$\pi SCL_{atv-OB} = \frac{SCL}{K_{scl,1} + SCL} \quad (3.18)$$

$$\pi SCL_{atv-OCY} = \frac{SCL}{K_{scl,2} + SCL} \quad (3.19)$$

$$\pi PGE2_{atv} = \frac{PGE2}{K_{pge2} + PGE2} \quad (3.20)$$

$$\pi S1P_{atv} = \frac{S1P}{K_{s1p} + S1P}$$

(3.21)

$$\pi RANKL_{atv} = \frac{RANKL}{K_{rankl} + RANKL}$$

(3.22)

$$\pi SCL_{rep} = \frac{1}{1 + SCL/K_{scl,3}}$$

(3.23)

Os valores de cada constante estão dispostos na tabela 1. A escolha destes parâmetros se deu da seguinte forma. As populações foram iniciadas com valores que seguem a proporção de um osteoclasto para 10 osteoblastos aproximadamente (Ali *et al*, 2005; Aguirre, 2006). Já a população de osteócitos foi inicializada com um valor ligeiramente maior que a de osteoblastos. A população de osteoblastos, comparado a média indicada na literatura sobre histomorfometria óssea, é 10 vezes maior que a de osteócitos.

Os demais parâmetros foram selecionados de forma a descreverem comportamentos semelhantes ao encontrado na literatura. Desta forma, estes valores não são representações fiéis daqueles encontrados experimentalmente, caso fosse, por não estarem incluídos no modelo vários componentes que têm comportamento incerto ou não foram descobertos ainda, o sistema nunca entraria em equilíbrio. Assim, o modelo descreverá comportamentos qualitativos em detrimento da especificidade quantitativa.

TABELA 1. PARÂMETROS UTILIZADOS NA SIMULAÇÃO DO MODELO DE REMODELAMENTO ÓSSEO.

Símbolo	Valor	Unidade de medida	Descrição
OB_{ini}	72.14144204	Cel./mm ²	População inicial de osteoblastos
$preOB$	10	Cel./mm ²	População de precursores de osteoblastos
OCY_{ini}	121.64461248	Cel./mm ²	População inicial de osteócitos
OC_{ini}	7.06106828	Cel./mm ²	População inicial de osteoclastos
VOL_{ini}	100.0	%	Massa óssea inicial
βOB_1	3	Células/dia	Taxa de diferenciação de Osteoblastos (PGE2)
βOB_2	0.2	Células/dia	Taxa de proliferação de Osteoblastos (S1P)
βOC	2.0	Células/dia	Taxa de diferenciação de Osteoclastos
βOCY	0.52	Células/dia	Taxa de diferenciação de Osteócitos
σOB	0.43	Células/dia	Taxa de apoptose de Osteoblastos
σOC	0.09	Células/dia	Taxa de apoptose de Osteoclastos
σOCY	2.5	Células/dia	Taxa de apoptose de Osteócitos
βSCL	0.05	nM/dia	Taxa de síntese de Esclerostina
$\beta RANKL$	35	nM/dia	Taxa de síntese de RANKL
βOPG	0.09	nM/dia	Taxa de síntese de OPG por osteoblastos
$\beta S1P$	3.5	nM/dia	Taxa de síntese de S1P
$\beta PGE2$	0.05	nM/dia	Taxa de síntese de PGE2
σSCL	0.2	nM/dia	Taxa de degradação de Esclerostina
$\sigma RANKL$	0.8	nM/dia	Taxa de degradação de RANKL
σOPG	1.5	nM/dia	Taxa de degradação de OPG

σ_{S1P}	1.5	nM/dia	Taxa de degradação de S1P
σ_{PGE2}	1.2	nM/dia	Taxa de degradação de PGE2
$K_{scl,1}$	14	nM	Coeficiente de ativação de Esclerostina para OB
$K_{scl,2}$	25	nM	Coeficiente de ativação de Esclerostina para OCY
$K_{scl,3}$	6	nM	Coeficiente de repressão de Esclerostina
K_{s1p}	35	nM	Coeficiente de ativação de S1P
$K_{pge2,1}$	9	nM	Coeficiente de ativação de PGE2 para proliferação de osteoblastos
$K_{scl,2}$	7.5	nM	Coeficiente de ativação de PGE2 para produção de RANKL
$K_{scl,3}$	3	nM	Coeficiente de repressão de PGE2
$K_{RANKL-OPG}$	0.5	nM/OPG	Constante de associação entre RANKL e OPG
$K_{RANKL-RANK}$	6	nM/RANK	Constante de associação entre RANKL e RANK
K_{rankl}	4	nM	Coeficiente de ativação de RANKL
κ_{Form}	0.0184486541475	%	Taxa de formação de tecido ósseo por osteoblastos
κ_{Reabs}	0.09	%	Taxa de reabsorção de tecido ósseo por osteoclastos
$RANK$	10	nM	Concetração de RANK
$S1P_{max}$	50	nM	Capacidade máxima de suporte para S1P
$RANKL_{max}$	35	nM	Capacidade máxima de suporte para RANKL
SCL_{max}	60	nM	Capacidade máxima de suporte para SCL
OPG_{max}	50	nM	Capacidade máxima de suporte para OPG

<i>PGE2max</i>	50	nM	Capacidade máxima de suporte para PGE2
----------------	----	----	--

A implementação do sistema foi realizada em linguagem Python que possui diversas bibliotecas e pacotes voltados para o desenvolvimento de análise numérica, e visualização de dados. A biblioteca *numpy*, dependente da *scipy*, possui a função *odeint*, que foi utilizada para a integração das equações diferenciais ordinárias do sistema. A geração de gráficos foi feita através da biblioteca *matplotlib*.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 VALIDAÇÃO

O principal método de avaliação de modelos matemáticos de sistemas biológicos consiste na perturbação de uma ou mais variáveis, seguida da validação a partir de sua correspondente biológica. Na figura 6 estão representadas redução e aumento de tensão no compartimento hipotético que contém o tecido.

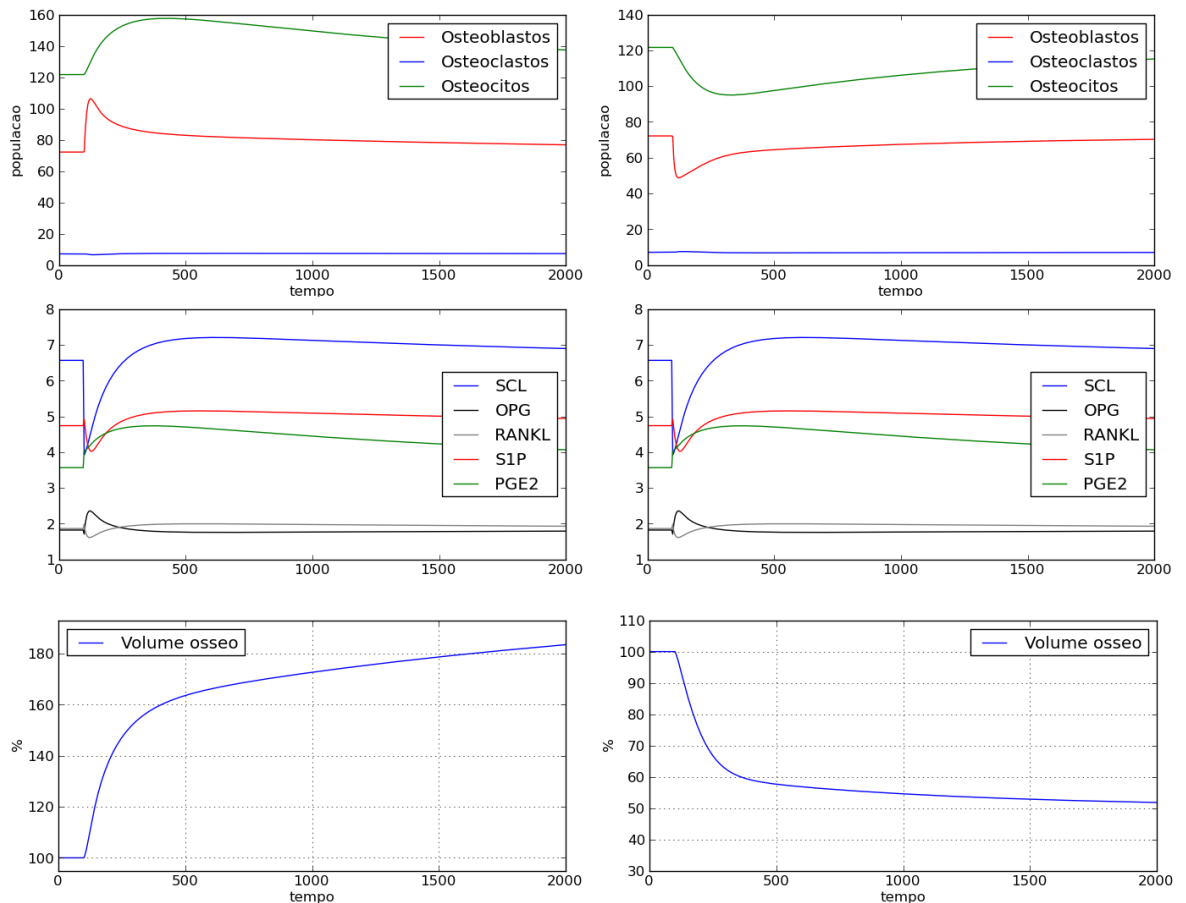


FIGURA 6 - DINÂMICA DAS POPULAÇÕES CELULARES E CONCENTRAÇÕES DE PROTEÍNAS APÓS ALTERAÇÕES NA TENSÃO ÓSSEA. ESQUERDA, TENSÃO CORRESPONDENTE A 200% DA NORMAL. DIREITA, 5% DA NORMAL. SCL – ESCLEROSTINA.

Nas duas simulações o comportamento qualitativo das variáveis é semelhante ao remodelamento ósseo em condições não patológicas. Em ambas o processo é

deflagrado pela modificação da tensão que inicialmente mantinha o sistema em equilíbrio.

Na figura 6, à direita, a redução da tensão é suficiente para elevar a taxa de produção da proteína esclerostina. Como já discutido anteriormente, algumas evidências apontam a necessidade da esclerostina para iniciar o remodelamento (Lin *et al*, 2009). A esclerostina aumenta a taxa de apoptose de osteoblastos produtores de OPG. Consequentemente, a queda de OPG disponibiliza RANKL suficiente para a diferenciação de osteoclastos.

Na figura 6, o quadro à esquerda representa o remodelamento induzido pelo aumento do estímulo mecânico, na qual as alterações nas concentrações destas proteínas e células progride de modo inverso. A inibição da produção de esclerostina permite a diferenciação de osteoblastos e produção acentuada de OPG, que reprime a população de osteoclastos. A consequência direta desta contenção dos osteoclastos é redução da produção de S1P, que de certo modo restringe a proliferação excessiva de osteoblastos.

Da mesma forma, o lipídio PGE2 é reduzido e multiplicado na reabsorção e deposição óssea, respectivamente. A grande diferença está no produto final destas alterações.

Apesar desse lipídio influenciar vários componentes do sistema, como o OPG, o RANKL e o crescimento de osteoblastos, este modelo contrasta com os dados experimentais que indicam a duplicidade de compartimento deste lipídio. Na literatura é encontrado indícios de que adição PGE2 exógeno é um forte estimulador da reabsorção de tecido em culturas celulares, efeito mediado pelo eixo OPG-RANKL. Por outro lado, sua capacidade osteogênica, através do aumento da diferenciação de osteoblastos, compensa esse atividade catabólica, resultando no

aumento expressivo da massa óssea verificado em ratos, cachorros e humanos (Komarova, 2005).

Outros estudos demonstraram que o PGE2 tem importância na adaptação do tecido ósseo ao aumento de estímulo mecânico. Por exemplo, foi verificado que a enzima COX-2, necessária para a produção do lipídio, aumenta sua expressão durante a mecanotransdução e a aplicação de anti-inflamatórios não esteroideais (NSAIDs) que inibe aquela enzima, limita a formação de tecido como resposta a aplicação de cargas (Komarova, 2005).

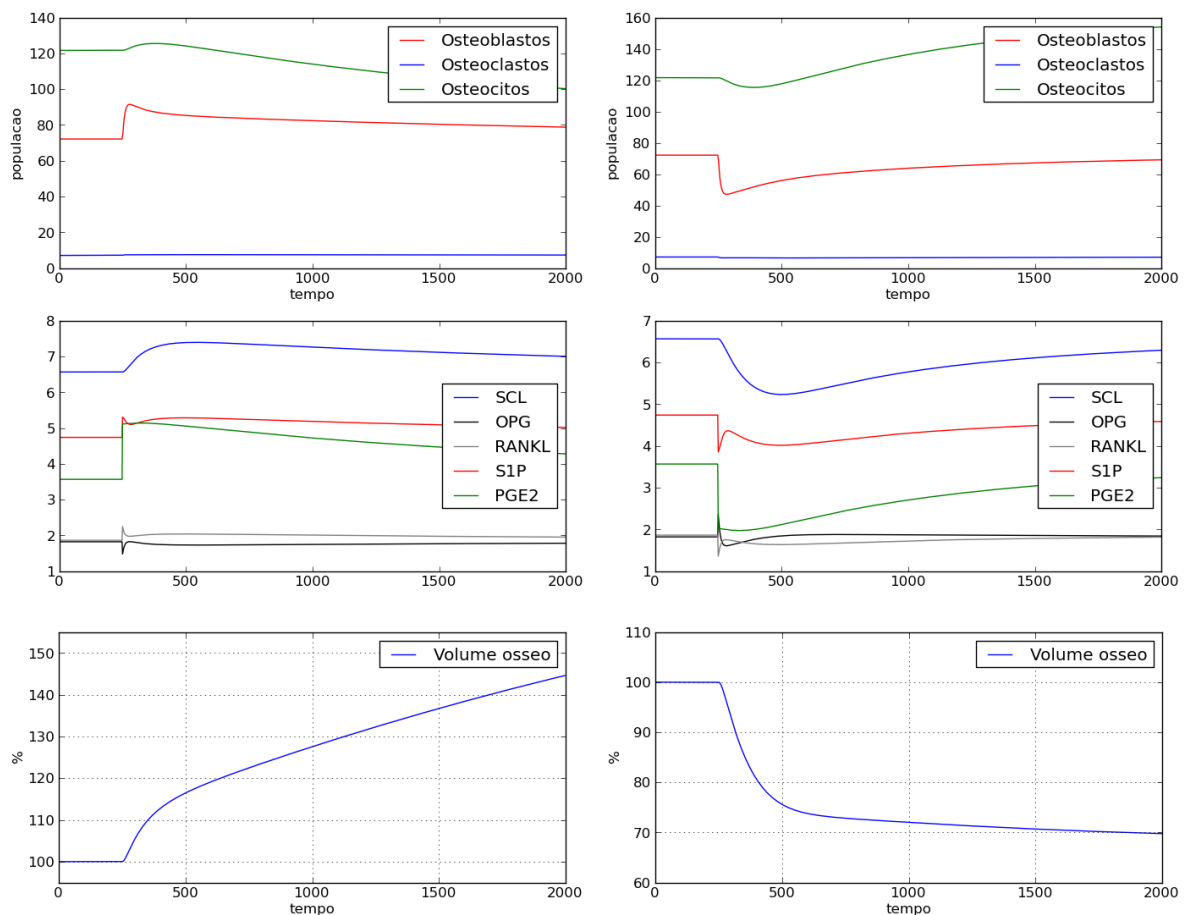


FIGURA 7 - PERTURBAÇÃO DA POPULAÇÃO DE CITOCINAS PGE2. AUMENTO DE 4 PONTOS À ESQUERDA E REDUÇÃO DE 3 PONTOS À DIREITA.

A figura 7 apresenta uma simulação com adição contínua de PGE2 externo. À esquerda, o aumento de 4 pontos e à direita a redução de 3 pontos, aproximadamente.

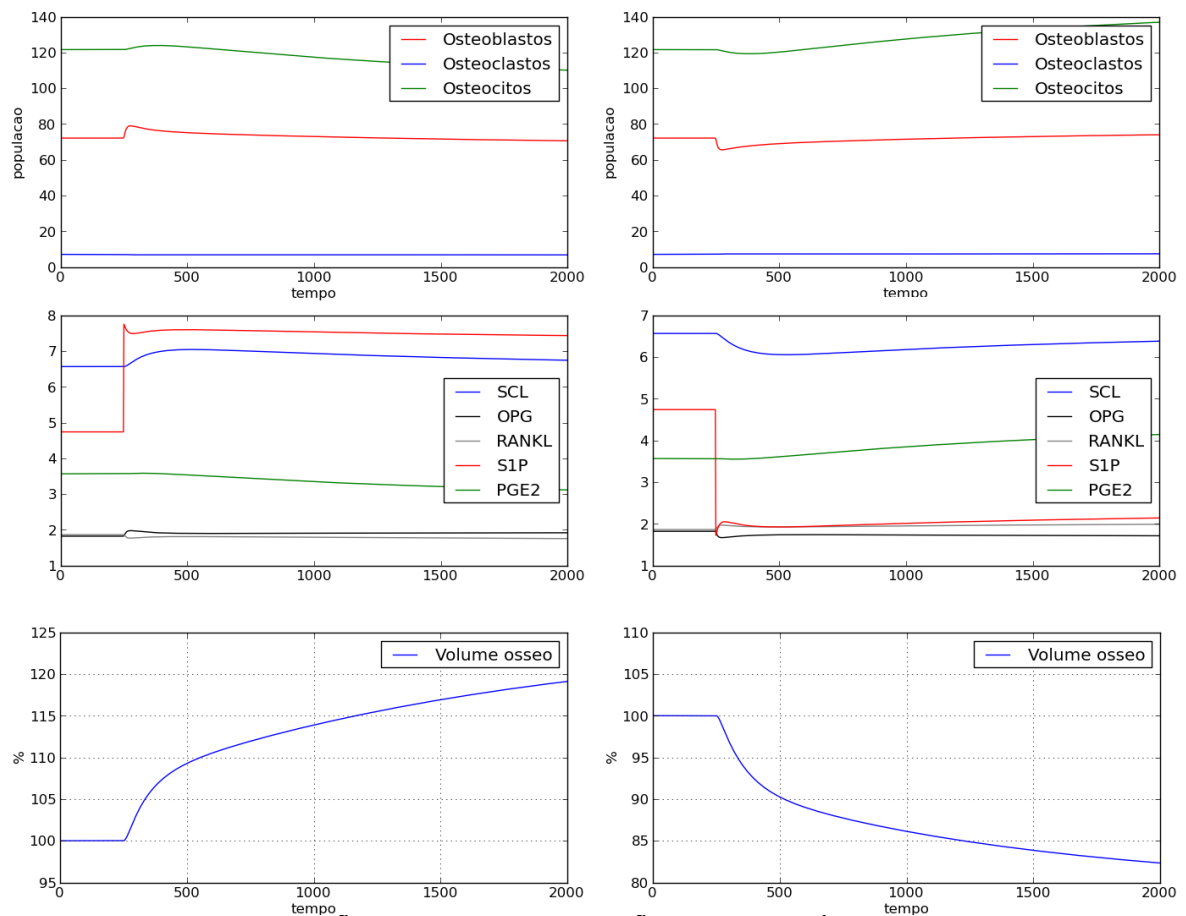


FIGURA 8 - PERTURBAÇÃO NA CONCENTRAÇÃO DE S1P. À ESQUERDA AUMENTO DE APROXIMADAMENTE 3 PONTOS. À DIREITA REDUÇÃO DE 3 PONTOS.

Na simulação, o aumento deste lipídio eleva a atividade do BMU, pelo aumento sutil da população de osteoclastos e mais acentuado de osteoblastos. A consequência direta deste evento é o aumento da massa óssea.

Com o progresso da reabsorção, os osteoclastos sintetizam o S1P que acopla a degradação e deposição óssea. Na figura 6, à esquerda, é possível verificar que com a ampliação do BMU e o aumento da população de osteoclastos, a concentração de S1P se eleva, mesmo que de forma atenuada, e consequentemente auxilia no aumento da população de osteoblastos. Porém, estas mesmas células, produtoras de OPG, reduzem a população de osteoclastos e assim a concentração de S1P. Evidências *in vivo* sobre a verdadeira função da S1P no

remodelamento ainda são escassas, sendo a única fonte de dados os experimentos *in vitro* (Ryu *et al*, 2006).

Neste ponto, apesar da baixa concentração desta proteína estimuladora, o número de osteoblastos ativos começa a decair lentamente até um estado de equilíbrio. Isto ocorre pois o aumento da massa óssea também elevou a população de osteócitos, produtores de PGE2. Estas proteínas recém sintetizadas garantem que o número de osteoblastos se mantenha elevado até que a tensão no tecido atinja níveis ótimos. Na figura 8 está demonstrado o efeito do S1P no sistema ósseo.

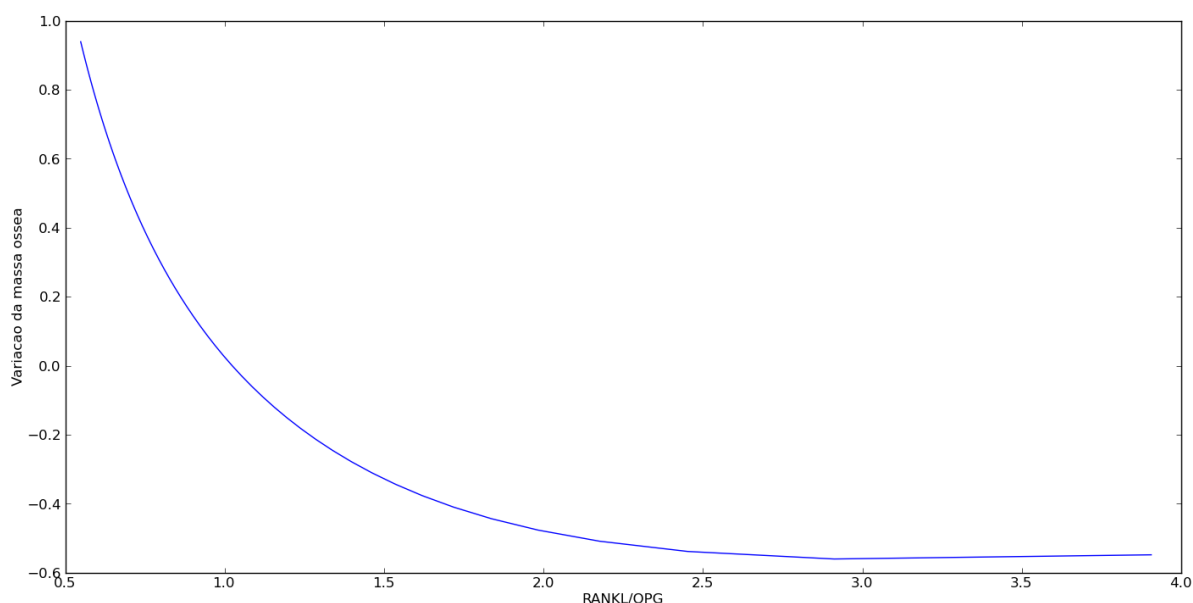


FIGURA 9 - CORRELAÇÃO ENTRE A RAZÃO RANKL/OPG E A VARIAÇÃO DA MASSA ÓSSEA.

Para que as populações de osteoclastos e osteoblastos sejam reguladas de forma apropriada, a atividade das proteínas RANKL e OPG devem estar sincronizadas com cada etapa do remodelamento. A razão entre a concentração de RANKL e OPG é frequentemente utilizada como indicador de remodelamento, seja para o lado da reabsorção ou formação óssea, sendo o valor de 1,17 o indicador de compensação, onde a variação da massa é nula. Na figura 9 está indicada a razão

RANKL/OPG e a taxa de variação da massa óssea, na figura 10 um exemplo de perturbação destas duas proteínas.

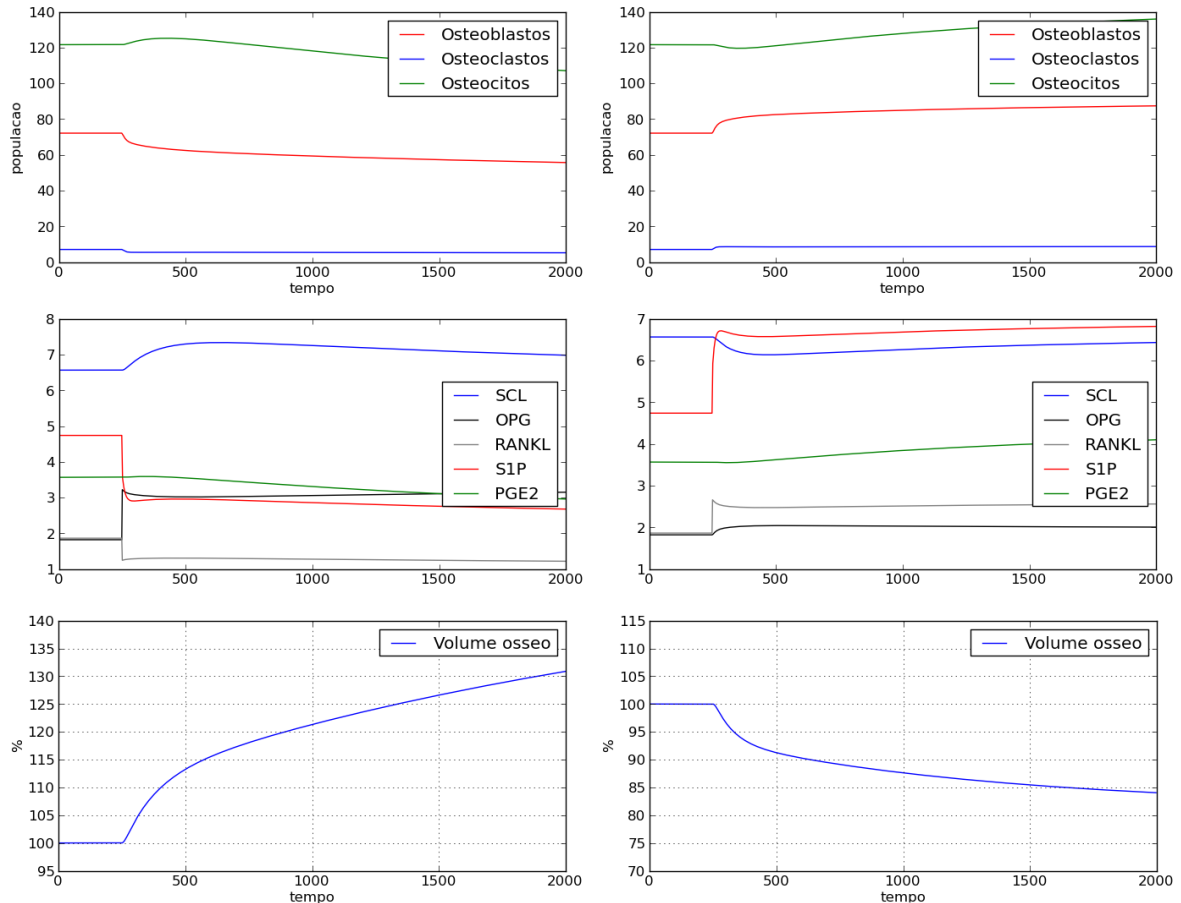


FIGURA 10 - ALTERAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE RANKL E OPG.À ESQUERDA, ADIÇÃO DE OPG, À DIREITA ADIÇÃO DE RANKL.

A produção de novo tecido ósseo, no caso do aumento do estímulo mecânico, é acompanhada pela diferenciação de osteoblastos em osteócitos. Sendo assim, a síntese de proteínas como a esclerostina também é elevada.

Conforme exposto por Matsuo, após a passagem do BMU e a formação de novo tecido os osteoblastos se tornam quiescentes presumivelmente com a ajuda da esclerostina secretada pelos osteócitos (Matsuo & Irie, 2008) através da sua capacidade de reduzir a deposição de tecido e diferenciação de osteoblastos. É este efeito, como mostra a figura 6 que guia o retorno do sistema à estabilidade.

4.2 ANÁLISE COMPARATIVA

Dos modelos desenvolvidos e encontrados na literatura até a presente data, dois foram escolhidos para uma análise comparativa. O primeiro, elaborado por Pivonka (Pivonka *et al*, 2010), do qual derivou este sistema proposto, e o segundo estruturado por Maldonado, que possui foco direto na função do estímulo mecânico para o remodelamento (Maldonado *et al*, 2006).

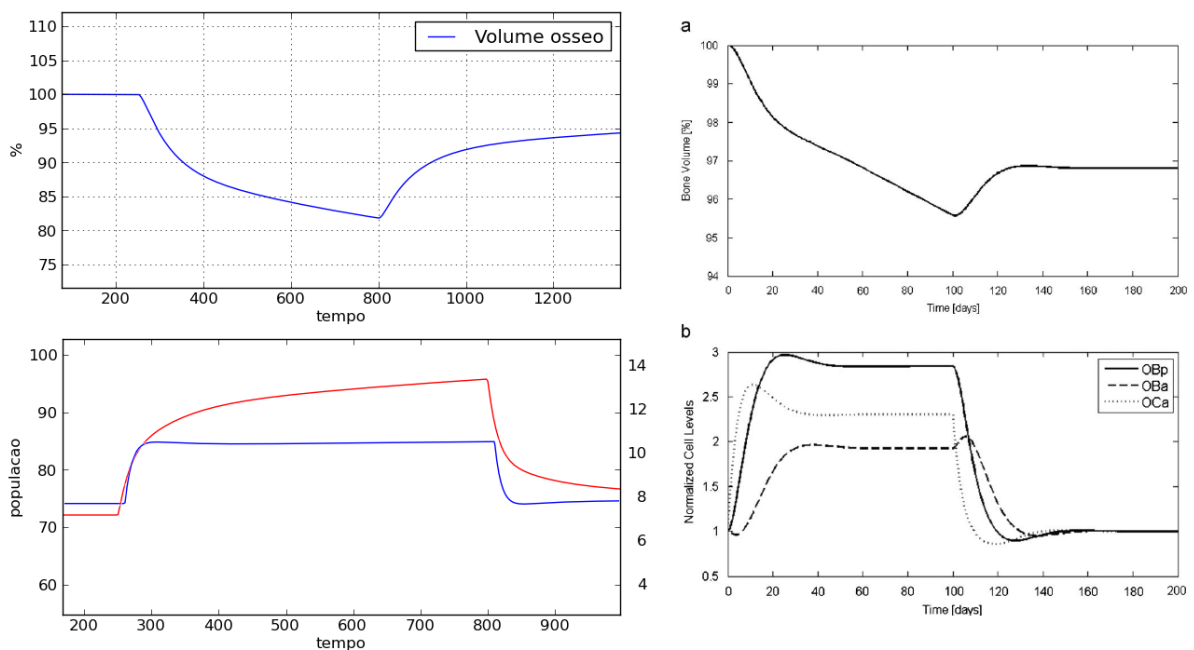


FIGURA 11 - COMPARAÇÃO QUALITATIVA ENTRE O MODELO PROPOSTO (ESQUERDA) E O DE PIVONKA, 2010 (DIREITA). REDUÇÃO DE OPG EM AMBOS OS CASOS. EM VERMELHO – OSTEOBLATOS; AZUL – OSTEOCLASTOS. OBP E OBA – OSTEOBLASTOS PRECURSORES E ATIVOS RESPECTIVAMENTE; OCA – OSTEOCLASTOS ATIVOS.

A figura 11 exemplifica as semelhanças e diferenças entre o sistema aqui proposto e o desenvolvido por Pivonka, numa situação onde houve adição de OPG ao tecido. Apesar das diferenças significativas que advêm do enxerto de novas variáveis e da disposição de suas interrelações, o comportamento qualitativo da variação do volume ósseo ainda é correspondente, o que indica que esta propriedade do sistema se manteve robusto.

equenas variações são detectadas quando se compara o progresso das populações de osteoblastos e osteoclastos. Os primeiros, no modelo proposto por Pivonka, atingem sua população máxima abruptamente logo após a apresentação do estímulo. Já o modelo proposto aqui progride de forma atenuada até a extinção da condição inicial.

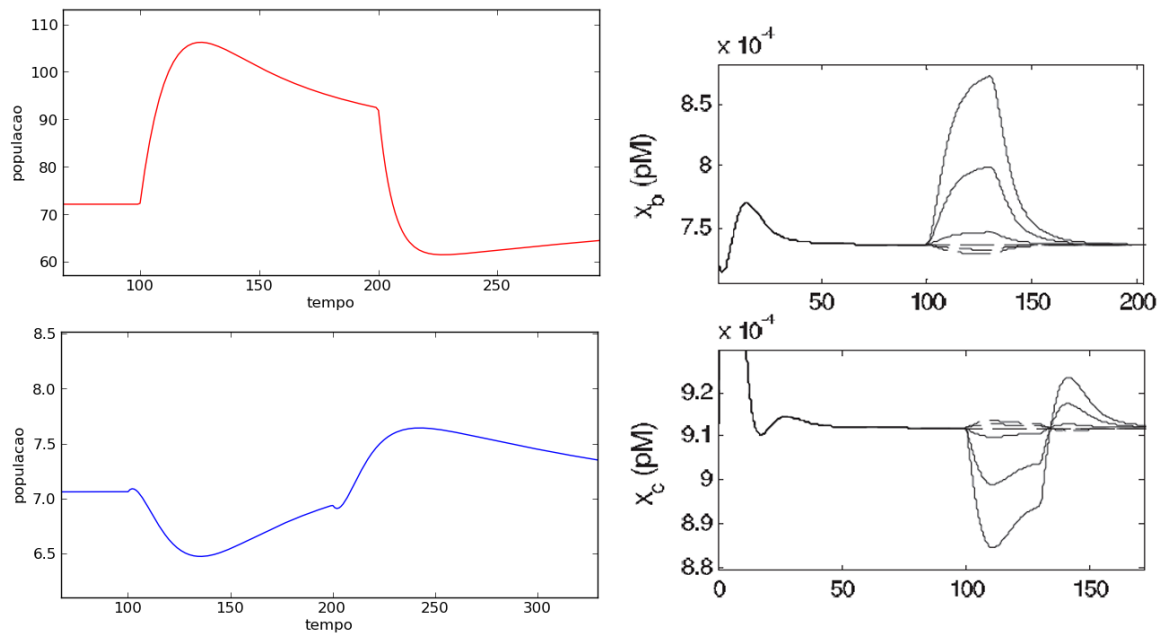


FIGURA 12 - PROGRESSO DAS POPULAÇÕES DA OSTEOCLASTOS E OSTEOBLASTOS, À ESQUERDA DO MODELO AQUI PROPOSTO E À DIREITA MALDONADO, 2006. EM VERMELHO – OSTEOBLASTOS; AZUL – OSTEOCLASTOS. x_b – OSTEOBLASTOS; x_c – OSTEOCLASTOS.

A figura 12 é um comparativo entre o modelo desenvolvido por Maldonado e o proposto aqui. Semelhante ao modelo elaborado por Pivonka, as diferenças entre os sistemas também estão relacionadas às variáveis utilizadas, neste caso principalmente às que conferem sensibilidade do tecido à estímulos mecânicos.

No modelo descrito por Maldonado, a transdução biomecânica é realizada por osteócitos a partir da síntese de óxido nítrico e PGE2. A primeira molécula estimula a produção de OPG e a segunda aumenta a proliferação de osteoblastos. No

modelo aqui proposto, além da PGE2, que possui a mesma atividade, a esclerostina substitui o óxido nítrico, alterando o modo como o remodelamento é desencadeado.

Enquanto o óxido nítrico está correlacionado ao OPG, a esclerostina está ligada a síntese de osteoblastos. Ou seja, o modelo proposto por Maldonado assume que o início do remodelamento positivo está ligado a inibição de osteoclastos, enquanto o proposto aqui defende a hipótese do liberamento dos osteoblastos.

Mesmo não levando a diferenças tão marcantes no comportamento qualitativo do sistema, como demonstrado através da semelhança no progresso das populações de osteoclastos, esta divergência pode ser significativa em futuros estudos de intervenção farmacológica, já que o foco pode ser deslocado de uma população celular para outra.

4.3. RESULTADOS

A adaptação do tecido ósseo a estímulos mecânicos depende da resultante entre a reabsorção e deposição de matriz. Nesta simulação, este produto é resultado direto da proporção de osteoblastos e osteoclastos que compõe o BMU. A figura 11 mostra a relação entre a razão entre estas duas células e a taxa de variação da massa óssea e a alteração desta razão é resultado do estímulo mecânico, como mostra a figura 12.

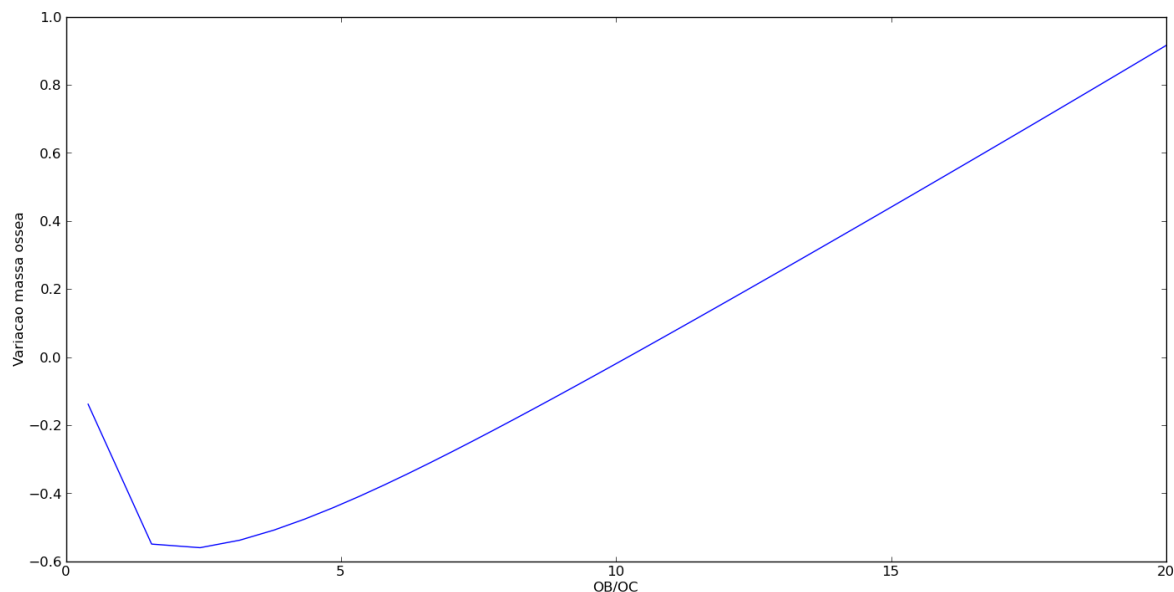


FIGURA 13 - VARIAÇÃO DA MASSA ÓSSEA EM RELAÇÃO A RAZÃO ENTRE OSTEOLASTOS E OSTEOLASTOS.

No entanto, conforme a carga vai se aproximando de zero, a taxa de reabsorção começa a diminuir até o ponto onde não há mais remodelamento. A causa deste fenômeno está ligada a proteína esclerostina, que com tão baixo estímulo, é expressa em quantidades anormais e elimina uma grande porção de osteoblastos e osteoclastos. Assim, mesmo que a população de osteoclastos seja maior que a de osteoblastos, devido a redução excessiva dessas não há formação do BMU para efetuar o remodelamento. A taxa de variação do volume ósseo quando se aproxima de zero está diposta na figura 13.

De fato, caso este evento seja realmente possível, dificilmente deverá acontecer *in vivo*. Questões espaciais são de extrema importância em sistemas biológicos e neste caso, no remodelamento ósseo, possivelmente a migração de osteoblastos e osteoclastos, vindas de regiões onde a morte celular induzida pela esclerostina seja menor, suprimiria tal necessidade. Além disso, também não há conhecimento suficiente sobre a biologia da esclerostina, se ela é produzida até um certo limite ou se sua influência no destino celular é restrita. Asserções mais detalhadas requerem simulações que levem em conta variáveis espaciais.

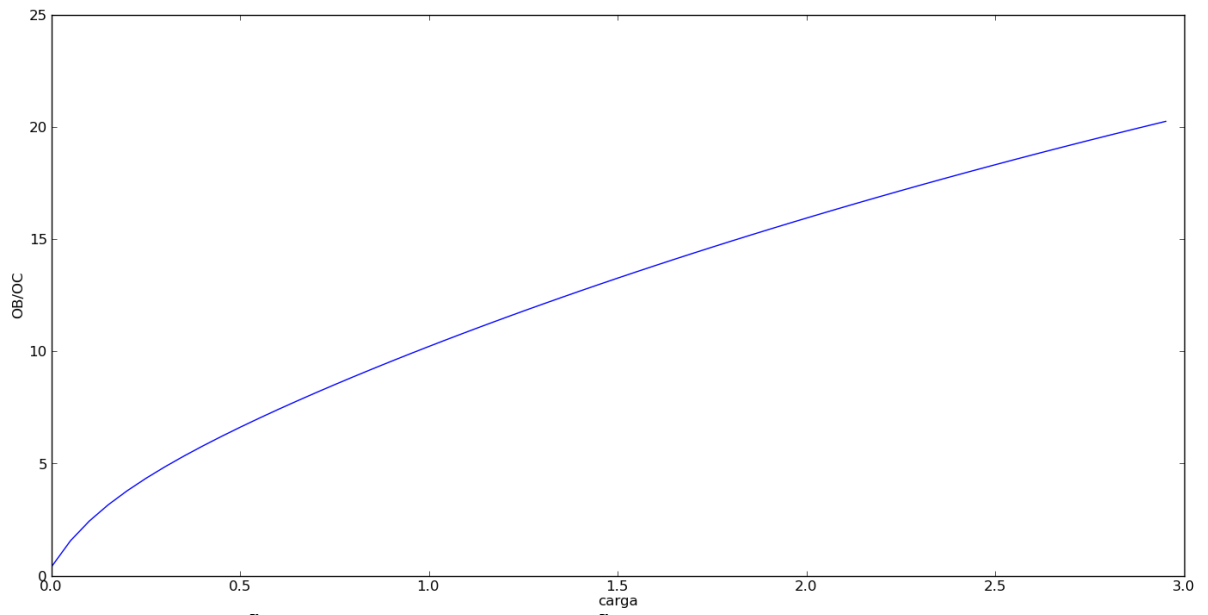


FIGURA 14 - RELAÇÃO ENTRE CARGA E A RAZÃO OSTEOLASTOS/OSTEOCLASTOS.

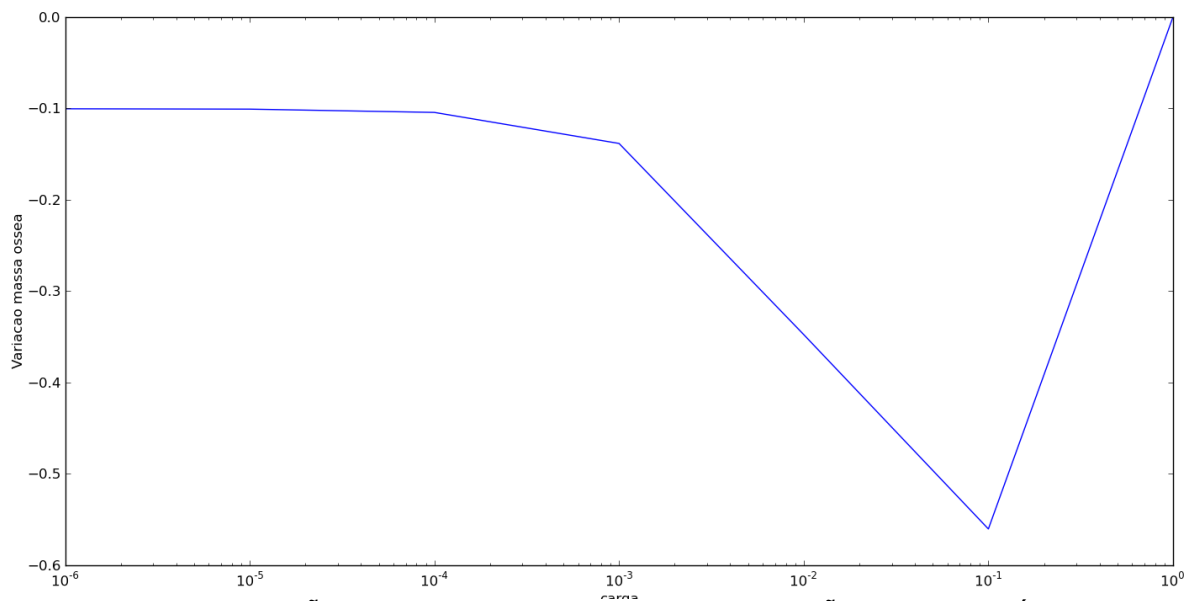


FIGURA 15 - CORRELAÇÃO ENTRE CARGA E A TAXA DE VARIAÇÃO DA MASSA ÓSSEA.

5 CONCLUSÃO

Este trabalho propõe um modelo matemático da biologia óssea voltado ao fenômeno do remodelamento. A validação de um modelo depende da sua correspondência com evidências experimentais, fato que permite a sustentação de hipóteses advindas de observações do modelo. No entanto, devido a extrema complexidade dos sistemas biológicos, muitas vezes é fundamental o aperfeiçoamento do modelo com novas variáveis descobertas pela experimentação, visando sempre a aproximação da simulação e da realidade.

Esse foi o principal foco deste estudo, adicionar uma nova variável a esses sistemas e analisar sua atuação. Com a esclerostina, a formação da unidade multicelular óssea (BMU) se torna direcionada. Variações na concentração desta proteína pode desencadear a reabsorção ou formação de tecido mineralizado, e dependendo dessa variação, caso negativa ou positiva, verifica-se que também varia a proporção entre osteoblastos e osteoclastos, respectivamente, devido a inibição tanto da deposição de matrix extracelular e da formação de osteoblastos por essa proteína.

Além disso, um modelo matemático que simule as características básicas do sistema ósseo e fundamentado em informações extraídas da literatura experimental, fornece as ferramentas necessárias para estudos mais avançados, que incluem discriminação espacial como migração celular, campos de tensões distribuídos e a organização do próprio BMU.

Com o aumento progressivo da complexidade desses modelos e com a corroboração dos resultados obtidos, se torna possível extrair conclusões sobre tais sistemas que não poderiam ser adquiridos por outros métodos.

6 REFERÊNCIAS

AGUIRRE, J.I; PLOTKIN, L.I; STEWART, S.A; WEINSTEIN, R.S; PARFITT, A.M; MANOLAGAS, S.C; BELLIDO, T. Osteocyte apoptosis is induced by weightlessness in mice and precedes osteoclast recruitment and bone loss. **J Bone Min Res.** v. 21. 2006.

ALI, A.A; WEINSTEIN, R.S; STEWART, S.A; PARFITT, A.M; MANOLAGAS, S.C; JILKA, R.L. Rosiglitazone causes bone loss in mice by suppressing osteoblast differentiation and bone formation. **Endocrinology.** v.146. 2005.

BLACKWELL, K.A; RAISZ, L.G; PILBEAM, C.C. Prostaglandin in bone: bad cop, good cop. **Trends in Endocrinology and Metabolism.** v.21. 2010.

BOYCE, B.F; XING, L. Biology of RANK, RANKL and osteoprotegerin **Arthritis Research & Therapy.** Vol 9. 2007.

BOYLE, W.J; SIMONET, W.S; LACEY, D.L. Osteoclasto differentiation and activation. **Nature.** v. 423. 2003.

BURGUER, E; KLEIN-NULEND, J. Mechanotransduction in bone – role of the lacuno-canalicular network. **The FASEB Journal.** v. 13. 1999.

CAPLAN, A.I. Mesenchymal stem cells: cell based reconstructive therapy in orthopadics. **Tissue Engineering.** vol 11. 2005.

CLARKE, B. Normal Bone Anatomy and Physiology. **Clin J Am Soc Nephrol.** Vol 3. 2008.

GAUDIO, A; PENNISI, P; BRATENGEIER, C; TORRISI, V; LINDNER, B; MANGIAFICO, R.A; PULVIRENTI, I. HAWA, G; TRINGALI, G; FIORE, C.E. Increased sclerostin serum levels associated with bone formation and resorption markers in patients with immobilization-induced bone loss. **J Clin Endocrinol Metab.** v. 95. 2010.

GUYTON, A.C; HALL, J.E. **Tratado de fisiologia médica.** 11a ed, Guanabara, Rio de Janeiro. 2006.

HARADA, S; RODAN, G. Control of osteoblast function and regulation of bone mass. **Nature.** v. 423. 2003.

HIGGINS, J.P. Nonlinear systems in medicine. **Yale Journal of Biology and Medicine.** v. 75. 2002.

HUANG, J.C; SAKATA, T; PFLEGER, L.L; BENCSIK, M; HALLORAN, B.P; BIKLE, D.D; NISSENSON, R.A. PTH differentially regulates expression of RANKL and OPG. **J Bone Min Res.** Vol 19. 2004.

IDEKER, T; WINSLOW, L.R; LAUFFENBURGER, A.D. Bioengineering and Systems Biology. **Annals of Biomedical Engineering.** Vol 32. 2006.

JAWORSKI, Z.F.G; DUCK, B; SEKALY, G. Kinetics of osteoclasts and their nuclei in evolving secondary haversian systems. **J Anat.** v. 133. 1981.

JUNQUEIRA, L.C; CARNEIRO, J. Tecido ósseo, in: **Histologia Básica.** 10 ed. Editora Guanabara Koogan. 2004.

KOMAROVA, S.V. Mathematical model of paracrine interactions between osteoclasts and osteoblasts predicts anabolic action of parathyroid hormone on bone. **Endocrinology**. v. 146. 2005.

KOMAROVA, S.V; SMITH, R.J; DIXON, S.J; SIMS, S.M; WAHL, L.M. Mathematical model predicts a critical role for osteoclast autocrine regulation in the control of bone remodeling. **Bone**. v. 33. 2003.

LEMAIRE, V. TOBIN, F.L; GRELLER, L.D; CHO, C.R; SUVA, L.J. Modeling the interactions between osteoblast and osteoclast activities in bone remodeling. **J Theor Biol**. vol 229. 2004.

LIN, C; JIANG, X; DAI, Z; GUO, X; WENG, T; WANG, J; LI, Y; FENG, G; GAO, X; HE, L. Sclerostin mediates bone response to mechanical unloading through antagonizing Wnt/Beta-catenin signaling. **J Bone Miner Res**. v. 24. 2009.

MALDONADO, S; BORCHERS, S; FINDEISEN, R; ALLGOWER, F. Mathematical modeling and analysis of force induced bone growth. **Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc**. v. 1. 2006.

MATSUO, K; IRIE, N. Osteoclast-osteoblast communication. **Arch Biochem Bioph**. v. 476. 2008.

MELTON III, L.J; CHRISCHILLES, E.A; COOPER, C; LANE, A.W; RIGGS, B.L. How many women have osteoporosis?. **J Bone Min Res**. v. 7. 1992.

MILLER, S.B. Prostaglandins in health and disease: an overview. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**. v. 36. 2006.

MOROZ, A; CRANE, M.C; SMITH, D; WIMPENNY, D.I. Phenomenological model of bone remodeling cycle containing osteocyte regulation loop. **Biosystems**. v. 84. 2006.

NICOLIS, G. Nonlinear behavior in the physical sciences and biology: some typical examples, in: **Introduction to nonlinear science**. Ed. Cambridge University Press. 1995.

PIVONKA, PETER; ZIMAK, J; SMITH, D.W; GARDINER, B.S; DUNCAN, C.R; SIMS, A.N; MARTIN, T.J; MUNDY, G.R. Model structure and control of bone remodeling: **A theoretical study**. *Bone*. v. 43. 2008.

PIVONKA, PETER; ZIMAK, J; SMITH, D.W; GARDINER, B.S; DUNCAN, C.R; SIMS, A.N; MARTIN, T.J; MUNDY, G.R. Theoretical investigation of the role of the RANK-RANKL-OPG system in bone remodeling. **J Theor Bio**. vol. 262. 2010.

ROBLING, A.G; CASTILLO, A.B; TURNER, C.H. Biomechanical and Molecular Regulation of Bone Remodeling. **Annu. Rev. Biomed. Eng**. Vol 8. 2006.

ROBLING, A.G; NIZIOLEK, P.J; BALDRIDGE, L.A; CONDON, K.W; ALLEN, M.R; ALAM, I; MANTILA, S.M; GLUHAK-HEINRICH, J; BELLIDO, T.M; HARRIS, S.E; TURNER, C.H. Mechanical stimulation of bone in vivo reduces osteocyte expression of Sost/sclerostin. **J Biol Chem**. Vol 283. 2008.

ROSENFELD, N; YOUNG, J.W; ALON, U; SWAIN, P.S; ELOWITZ, M.B. Gene regulation at the single-cell level. **Science**. v.307. 2005.

RYSER, M.D; NIGAM, N; KOMAROVA, S. Mathematical modeling of spatio-temporal dynamics of a single bone multicellular unit. **J Bone Min Res**. v. 24. 2009.

RYU, J; KIM, H.J; CHANG, E; HUANG, H; BANNO, Y; KIM, H. Sphingosine-1-phosphate as a regulator of osteoclast differentiation and osteoclast-osteoblast coupling. **The EMBO Journal**. v. 25. 2006.

SHAHNAZARI, M; YAO, W; CORR, M; LANE, N.E. Targeting the Wnt signaling pathway to augment bone formation. **Curr Osteoporos Rep**. v. 6. 2008.

SILVESTRINI, G; BALLANTI, P; PATACCHIOLI, F; LEOPIZZI, M; GUALTIERI, N; MONNAZI, P; TREMANTE, E; SARDELLA, D; BONUCCI, E. Detection of osteoprotegerin (OPG) and its ligand (RANKL) mRNA protein in femur and tibia of the rat. **J Mol Hist**. v. 36. 2005.

SUTHERLAND, M.K; GEOGHEGAN, J.C; YU, C; TURCOTT, E; SKONIER, J.E; WINKLER, D.G; LATHAM, J.A. Sclerostin promotes the apoptosis of human osteoblastic cells: a novel regulation of bone formation. **Bone**. v. 35. 2004.

TORTORA, G.J; GRABOWSKI, S.R. O sistema esquelético, in: **O corpo humano**. 6 ed. Editora Artmed. 2006.