

MECANOBIOLOGIA DA REGENERAÇÃO ÓSSEA: FATORES IMPORTANTES E MÉTODOS DE ESTUDO

Elton Diêgo Bonifácio, UFVJM / UFU, elton.bonifacio@ict.ufvjm.edu.br

Marcília Valéria Guimarães, LPM/FEMEC, mvvgmad@gmail.com

Márcio P. Souza, UFU, marcioperes@ufu.br

Libardo Andrés González Torres, UFVJM, lgonzales@ict.ufvjm.edu.br

Cleudmar Amaral de Araújo, UFU, cleudmar.araujo@ufu.br

Resumo. A regeneração óssea é um fenômeno complexo que envolve a interação de diversos eventos biológicos como proliferação, diferenciação e migração celular acoplado com as forças mecânicas. A migração celular desempenha um papel vital no regulamento do comportamento dos seres vivos e em particular na cicatrização óssea. Estudos mostram que a variação das propriedades bioquímicas e mecânicas da matriz extracelular podem afetar a migração celular. Assim, existe a necessidade de entender os mecanismos envolvidos no processo de migração durante a regeneração óssea. Os avanços recentes nos modelos computacionais aliados ao emprego de novas abordagens experimentais como o uso da microfluídica tem contribuído no estudo da mecanobiologia e migração celular. Contudo, há uma carência de trabalhos dedicados ao entendimento da influência de diversos fatores na migração celular relacionada à regeneração óssea. O objetivo deste artigo, parte de uma pesquisa em fase inicial, consiste em apresentar uma revisão do estado da arte acerca da regeneração óssea e migração celular.

Palavras chave: Regeneração Óssea. Migração Celular. Microfluídica. Modelagem. Processos biológicos.

1. INTRODUÇÃO

A capacidade do osso de se regenerar é única, diferentemente de outros tecidos, e ele é capaz de se regenerar sem formar cicatriz fibrosa (Marsell; Einhorn, 2011; Betts; Müller, 2014). A medida em que o desenvolvimento e o acesso ao transporte motorizado aumentaram, houve também um aumento considerável nos traumas e fraturas de ossos longos (Ghiasi et al., 2017). A fratura óssea é um dos danos mais recorrentes no homem, e está associado com tratamentos de custo elevado, perda de produtividade, incapacidade individual e consequentemente um elevado impacto socioeconômico (Pivonka; Dunstan, 2012; Bonafede; Espindle; Bower, 2012). Ghiasi et al. (2017) destacam que são gastos bilhões de dólares com tratamentos associados às fraturas ósseas. Torres et al. (2010) apontam que nos EUA, por exemplo, estima-se que ocorra cerca de 5,6 milhões de fraturas e o gasto estimado com o tratamento de doenças musculoesquelética é de 215 bilhões de dólares por ano.

A cicatrização óssea é um complexo processo fisiológico que substitui o osso fraturado por osso novo, renovando, assim, as propriedades mecânicas e biológicas do osso (Sathyendra; Darowish, 2013). Esse processo envolve uma complexa interação de eventos no ambiente biológico próximo ao local da fratura acoplado com o impacto das forças mecânicas nos arredores da lesão. No entanto, ainda não é completamente compreendido como a migração e a diferenciação estão relacionadas com os fatores mecânicos (Anderson et al., 2014).

Como alternativa aos modelos complexos e de custo elevados *in vivo*, tais como aqueles que estudam a regeneração óssea, modelos *in vitro* de microfluídica tem sido amplamente usado para estudar vários fenômenos biológicos (Menon et al., 2015). Esses modelos têm sido utilizado, pois permitem estudar de forma isolada e padronizada diferentes processos biológicos de interesse. Por exemplo, Somaweera; Ibraguimov; Pappas (2016) destacam que os dispositivos de microfluídica, conhecidos como *lab-on-chips* ou *organ-on-chips*, em particular aqueles que promovem o gradiente químico, têm sido empregados nos ensaios biológicos. Os gradientes químicos dentro do corpo humano regulam vários processos biológicos, como por exemplo, a proliferação e diferenciação celular, a cicatrização de feridas, a inflamação o espalhamento do câncer por meio da metástase além do efeito de fármacos sobre estes processos biológicos (Borau; Kamm; García-Aznar, 2011; Anderson et al., 2014; Somaweera et al. 2016).

De interesse particular é o estudo da migração celular em microambiente controlado devido ao seu papel vital na regeneração de fraturas ósseas bem como em uma grande quantidade de processos fisiológicos, como por exemplo, a morfogênese, metástase (Borau; Kamm; García-Aznar, 2011) progressão de doenças e regeneração tecidual dentre outros. Estudos mostram que a variação das propriedades bioquímica e mecânicas da matriz extracelular (MEC) podem afetar a migração celular (Menon et al., 2015). No caso da cicatrização de feridas as células, como por exemplo, os neutrófilos e macrófagos migram para o local da ferida para matar os microrganismos que causam infecção e os fibroblastos e as células osteoprogenitoras (células que se diferenciam em células ósseas) migram para remodelar a estrutura danificada (Ananthakrishnan; Ehrlicher, 2007).

Dessa forma, existe a necessidade de entender os mecanismos envolvidos em processos biológicos tais como a cicatrização óssea a fim de desenvolver estratégias que garantam o sucesso dos tratamentos. No caso do processo de regeneração óssea, apesar do osso possuir a capacidade de autorregenerar, sem deixar cicatriz, em alguns casos, tais como em fraturas patológicas ou situações de grandes defeitos nos ossos, a cicatrização pode falhar. O atraso na cicatrização ou

uma regeneração incompleta representa um dos maiores desafios clínicos. Esses desafios podem ser superados compreendendo os processos básicos que acontecem durante a regeneração do tecido ósseo.

Este artigo é parte de uma pesquisa, em fase inicial, que visa investigar os mecanismos e os parâmetros (fatores químicos e mecânicos) que influenciam a migração celular durante o processo de regeneração óssea. Assim, o objetivo principal deste artigo consiste em apresentar uma revisão do estado da arte acerca da regeneração óssea e migração celular.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Biologia do processo de regeneração óssea

O osso pode ser fraturado de várias maneiras incluindo trauma, infecções, tumores e o comprometimento do suprimento sanguíneo (Tortora 2009; Sathyendra; Darowish, 2013). A regeneração óssea é um processo altamente complexo que envolvem a participação de diferentes tipos de células (células do sistema imune, células progenitoras e células mesenquimais), sinalização molecular (citocinas, fatores de crescimento e quimiocinas) e múltiplos eventos em diferentes escalas (nível molecular, celular e tecidual) com o objetivo de restaurar a estrutura e funcionalidade do osso fraturado (Torres et al., 2010; Sathyendra; Darowish, 2013; Schlundt et al., 2015).

Esse processo envolve uma complexa interação de eventos no ambiente biológico como proliferação, migração e/ou diferenciação de células tronco mesenquimais, fibroblastos, células cartilaginosas que sintetizam diferentes tecidos próximo ao local da fratura acoplado com o impacto das forças mecânicas nos arredores da lesão (Torres et al., 2010; Sathyendra; Darowish, 2013; Ghiasi et al., 2017).

Apesar dos avanços nos tratamentos e implantes de fixação óssea, ainda existem dificuldades na cicatrização sendo que aproximadamente 5 a 10% das fraturas não são bem-sucedidas (Betts; Müller, 2014; Schlundt et al., 2015). Diversos fatores influenciam direta ou indiretamente o processo de regeneração óssea como, por exemplo, fatores genéticos, fatores celulares e bioquímicos, idade do paciente, tipo de fratura, movimento interfragmentar, geometria da fratura, dentre outros fatores atuam em conjunto (Torres et al. 2010). Ghiasi et al., 2017 ressaltam que o entendimento dos aspectos bioquímicos e mecanobiológicos é crucial para que os ortopedistas possam criar ambientes adequados para uma cicatrização ótima.

O processo de regeneração óssea pode ser dividido em quatro fases que se sobrepõem: fase inflamatória (formação do hematoma de fratura); formação do calo fibrocartilaginoso (*soft callus*); formação do calo ósseo (*hard callus*) e remodelamento do osso (Figura 1).

Quando a fratura ocorre, inicia-se a fase inflamatória com o rompimento dos vasos sanguíneos. O sangue extravasado forma um coágulo em torno do local da fratura. Devido ao suprimento sanguíneo interrompido, as células ósseas dessa região morrem (Geris; Sloten; van Oosterwyck, 2009). Surgem capilares sanguíneos no hematoma de fratura e os macrófagos e neutrófilos, bem como os osteoclastos iniciam a remoção de tecido morto ou lesado em torno e dentro do hematoma conforme Fig. (1). Além disso, essas células secretam citocinas tais como IL-1, IL-6, TNF- α , e PGE₂ responsáveis por recrutar células mesenquimais e células osteoprogenitoras de vários locais como medula, músculos, vasos circundantes dentre outros (Sathyendra; Darowish, 2013).

O hematoma de fratura é invadido por capilares e fibroblastos proveniente do tecido conjuntivo circundante havendo a formação do tecido de granulação (Tortora 2009). Esse tecido de granulação proporciona uma estabilização provisória da fratura (Doblaré, García e Gómez 2004), sendo denominado de procalo. Em seguida, os fibroblastos migram para a região da fratura e sintetizam fibras de colágenos que contribuem para a união das extremidades do osso fraturado. Células osteogênicas se desenvolvem em condroblastos nas áreas do tecido avascular e produzem fibrocartilagem e tem-se então o calo fibrocartilaginoso (*soft callus*), conforme mostra a Fig.(1).

Nas áreas próximas do tecido ósseo saudável bem vascularizadas as células osteogênicas se desenvolvem em osteoblastos, que começam a produzir as trabéculas do tecido esponjoso. Com o tempo, a fibrocartilagem é convertida em osso esponjoso, e o calo é então denominado calo ósseo (*hard callus*) conforme mostra a Fig. (1).

Por fim, a última fase consiste na remodelação óssea conforme apresenta a Fig. (1). Nesta fase os fragmentos dos tecidos mortos ou lesados continuam sendo gradualmente reabsorvidos pelos osteoclastos. O osso compacto substitui o osso esponjoso em torno da periferia da fratura.

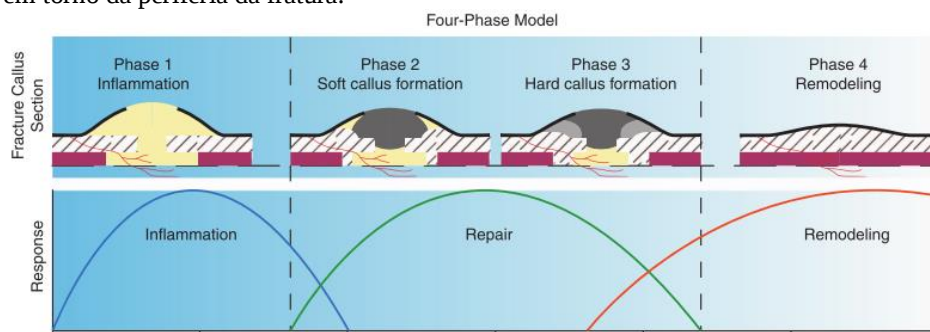


Figura 1. Modelo conceitual das quatro fases da regeneração óssea. Adaptado de Pivonka e Dunstan (2012)

Ghiasi et al. (2017) sugerem que o processo da regeneração óssea pode ser estudado por meio de duas abordagens: métodos experimentais e métodos computacionais. Ambos métodos tem suas vantagens e limitações. Os métodos experimentais apresentam resultados próximos das condições reais observadas em aplicações clínicas. No entanto, requerem equipamentos de última geração, alta precisão, condições controladas, alto custo e muitas vezes são influenciados por outros fatores como, por exemplo, variação genética (Ghiasi et al. 2017). Nesse sentido, os pesquisadores vem aplicando técnicas de modelagem computacional aplicados à simulação de células e tecidos e órgãos (*in silico*) afim de elucidar e complementar os modelos experimentais bem como implementar regras para as respostas observadas experimentalmente (Giorgi; Verbruggen; Lacroix, 2016).

Do ponto de vista do processo de regeneração óssea, os pesquisadores têm dedicado esforços para entender o comportamento das células quando o osso, ou o ambiente da fratura, é exposto a estímulos mecânicos. A qualidade e quantidade de tecido ósseo depende da capacidade de suas células reconhecerem e responderem a estímulos químicos e mecânicos. Existem muitas evidências experimentais da adaptação da massa e estrutura do osso quando submetido a estímulo mecânico, ocorrendo formação óssea em locais sujeitos a elevadas deformações e reabsorção onde as deformações são baixas (Rosa et al. 2015). Esses estímulos mecânicos desempenham um papel importante nos processos de proliferação e diferenciação das células e tecidos.

Os efeitos dos estímulos mecânicos na regulação das funções e processos das células e tecidos é objeto de estudo da mecanobiologia. Em outras palavras, a mecanobiologia explora a resposta biológica dos tecidos e células quando expostos a um estímulo mecânico (Giorgi; Verbruggen; Lacroix, 2016). A mecanobiologia do osso baseia-se no processo celular de mecanotransdução. O estudo da mecanobiologia é particularmente importante para o osso, que consiste de um material adaptativo que emprega um complexo sistema biológico para se auto remodelar em resposta ao estímulo mecânico (Rosa et al. 2015; Giorgi; Verbruggen; Lacroix, 2016)

Nesse contexto, a abordagem *in silico* tem ganhado destaque, uma vez que permite aos pesquisadores uma maior flexibilidade na manipulação das variáveis em estudo. Os avanços nos modelos computacionais têm estimulado pesquisas nesse campo, contribuindo para prever importantes fenômenos no nível tecidual como a diferenciação a migração e a proliferação bem como estudar as respostas no nível celular quando sujeitos a estímulo mecânico. Contudo, cabe ressaltar que qualquer modelo proposto para estudar fenômenos biológicos possuem limitações, seja nas condições de contorno ou mesmo simplificações assumidas na pesquisa.

Em trabalho recente Borgioni et al. (2017) destacaram que o papel da regulação mecânica e da atividade celular sobre os processos em grande escala como a formação/regeneração do osso não são bem compreendidos. É consenso na literatura que as células podem sentir o estímulo mecânico proveniente da matriz circundante e que esse estímulo influencia funções celulares como proliferação, migração e diferenciação (Rosa et al. 2015; Giorgi; Verbruggen; Lacroix, 2016; Borgoni et al. 2017).

Cada vez mais torna-se evidente que a fase inicial do processo de regeneração óssea (inflamação) desempenha um papel importante no resultado final da cicatrização. O entendimento da mecanobiologia dessa fase inicial pode ajudar a melhorar o resultado final da cicatrização óssea (Schlundt et al., 2015). Borgoni et al. (2017) mostram que até o momento não há modelos computacionais que contemplam as interações ocorrendo durante a inflamação ou considerando o papel das células imune sobre o processo de regeneração.

2.2. Migração celular

A migração celular desempenha um papel significativo no regulamento do comportamento dos sistemas vivos e em particular da cicatrização óssea (Sun e Zaman, 2017). A migração celular, seja de uma única célula ou de um conjunto de células, é um processo altamente dinâmico e um fenômeno essencial para diversos processos biológicos como o desenvolvimento embrionário, cicatrização de feridas, inflamação, metástase e resposta imune (Ananthakrishnan; Ehrlicher, 2007; Bershadskya e Kozlov, 2011; Borau; Kamm; García-Aznar, 2011; Sun e Zaman, 2017).

Muitos estudos têm mostrado que as propriedades do ambiente que circunda a célula desempenham um papel regulador fundamental na estrutura e função da célula, ou seja, a migração celular é modulada pelas propriedades da matriz extracelular (Driscoll e Danuser, 2016; Sun e Zaman, 2017; Ringer et al. 2017). Como exemplo, Paszek (2005 *apud* Ringer et al. 2017) mostram que o aumento da rigidez da MEC conduz a progressão de certos tumores de mama. As células podem se mover em uma ampla variedade de ambiente tridimensional *in vivo*, desde ossos até as regiões adjacentes às feridas. Driscoll e Danuser, (2016) destacam que as células usam modos diferentes de migrar quando estão em ambientes diferentes.

Estudos mostram que o citoesqueleto é fundamental no processo de migração da célula. O citoesqueleto consiste de uma rede de polímeros, composta basicamente por três biopolímeros: filamentos de actina, microtúbulos e filamentos intermediários. Os filamentos de actina e miosina, os microtúbulos e as proteínas motoras são responsáveis pela maioria dos movimentos celulares (Junqueira e Carneiro 2008). A migração inicia-se com uma polarização responsável por definir uma parte frontal e uma parte traseira da célula. Após essa polarização os passos seguintes são: protrusão da parte frontal da célula; adesão da parte frontal e desunião da parte traseira; contração da célula conforme ilustra a Fig. (2). Essas etapas não ocorrem necessariamente em sequência, ou seja, podem transcorrer simultaneamente (Ananthakrishnan; Ehrlicher, 2007; Danuser, Allard, Mogilner, 2013)

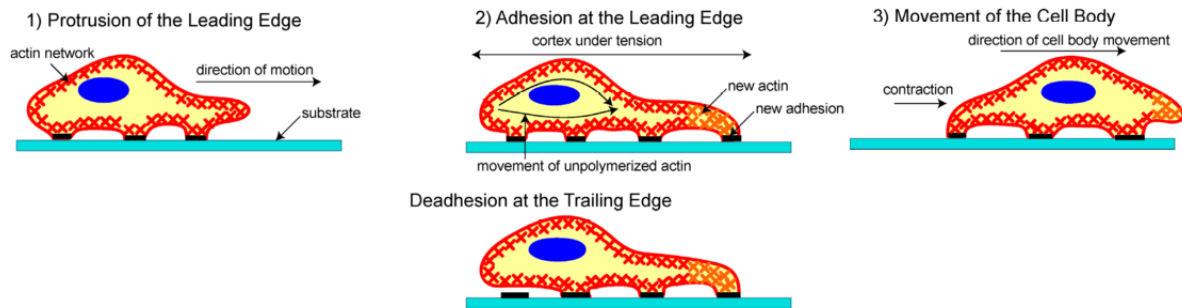


Figura 2. Esquema dos estágios da migração celular. Adaptado de Ananthakrishnan; Ehrlicher (2007)

O emprego da microfluídica como ferramenta para o estudo de migração celular é destacado em trabalho recente de Paul, Mistriotis e Konstantopoulos (2016) que apresentam um artigo de revisão sobre diferentes abordagens experimentais aplicadas ao estudo da migração de células. Nesse trabalho, Paul, Mistriotis e Konstantopoulos (2016) ressaltam a dificuldade do estudo da migração celular *in vivo* e que a abordagem *in vitro* deve buscar representar de forma mais fiel possível o ambiente em que a célula é inserida, apresentando a microfluídica como uma ferramenta com potencial para o estudo padronizado *in vitro* de processos regenerativos.

2.3. Microfluídica

A microfluídica se apresenta como uma poderosa ferramenta para análises biológicas, que permite estudar as funções das células bem como explorar suas atividades biológicas de interesse. Isto é justificado porque nos organismos, as células estão localizadas em microambientes complexos e sujeitas a diversos sinais que variam no espaço e no tempo, incluindo temperatura, concentração de oxigênio, gradientes de citocinas e sinalização de moléculas, forças mecânicas e interações com a MEC (He; Lin, 2017). O microambiente é significativamente importante para manter as funções celulares, inclusive a migração. Nesse sentido, a microfluídica permite a manipulação precisa da célula, simulando um microambiente fisiologicamente relevante, seletivo e confiável.

A microfluídica é um novo campo multidisciplinar emergente que lida com a manipulação de fluidos em micro e nanoescala (Mahed e Vaidya, 2017). Whitesides (2006) explica a microfluídica como a ciência e tecnologia de sistemas (*chips*) que processam ou manipulam pequenas quantidades de fluidos (10^{-9} a 10^{-18} litros) em canais de dimensões de algumas dezenas ou centenas de micrometros. Com sua origem em outras áreas da ciência, a microfluídica está começando a fazer mudanças em vários outros campos, especialmente no campo da biologia. Isso se dá em função das vantagens como a habilidade de conduzir ensaios com pequenas quantidades de amostra e reagentes, executar separação e detecção com alta resolução e sensibilidade, baixo custo, rápido processamento das amostras e miniaturização (Whitesides, 2006; Menon et al. 2015; Choi et al., 2016; Mahed e Vaidya, 2017). A Figura (3) mostra um exemplo de dispositivo de microfluídica utilizada em aplicações biológicas.

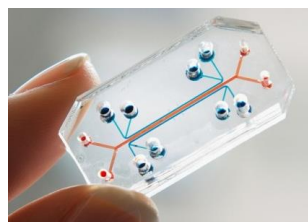


Figura 3. Exemplo de um modelo de dispositivo de microfluídica utilizado em aplicações biológicas.

Whitesides (2006) salienta que a microfluídica explora duas características importantes, o pequeno tamanho e o fluxo laminar nos microcanais. Mahed e Vaidya (2017) destacam que o número de Reynolds (Re) é baixo (menor que 1) e, como resultado, o fluxo em microescala é laminar. Isso é particularmente interessante, pois permite prever o transporte de moléculas através dos canais uma vez que a mistura ocorre apenas por difusão na interface dos líquidos.

Como alternativa aos modelos complexos e de custo elevado *in vivo*, os modelos *in vitro* utilizando dispositivos de microfluídica tem sido empregado para estudar diversos fenômenos biológicos (Menon et al. 2015). A microfluídica tem se tornado popular nos últimos anos devido a facilidade de reprodução, controle e monitoramento de uma variedade de fatores (químicos e biológicos) no microambiente dos experimentos (Amo et al. 2015, Somaweera et al 2016).

Abhyankar et al. (2003) demonstraram pela primeira vez com sucesso uma cultura de células embrionárias utilizando chips de microfluídica. Os autores destacam que a microfluídica é uma tecnologia promissora para cultura de células

embrionárias devido principalmente a escala de comprimento envolvida, pois permitem que diferentes fatores (ex. fatores de crescimento) acumulem localmente formando um microambiente estável para a célula. Abhyankar et al. (2003) ainda destacam que no futuro, será possível controlar esse tipo de diferenciação para desenvolver órgãos artificiais, assim como reparar sistemas internos danificados.

Em pesquisa recente, Menon et al. (2015) estudaram a migração celular em um microambiente controlado. Os autores investigaram a influência da combinação das propriedades da MEC na migração celular de células tronco mesenquimais utilizando ensaios de microfluídica. Os ensaios foram conduzidos em *chips* de PDMS com valores diferentes de rugosidade, rigidez e hidrofobicidade.

Amo et al. (2016) estudaram a influência dos fatores de crescimento durante a angiogênese usando dispositivos de microfluídica. A angiogênese é um processo de migração coletiva de células endoteliais com a finalidade de formar de novos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes. É um dos processos mais importantes durante a regeneração tecidual, pois fornece oxigênio e nutrientes para a região da fratura. Amo et al. (2016) justificam a utilização dos dispositivos de microfluídica, pois permitem reproduzir aspectos fundamentais da angiogênese e simular a cicatrização de feridas ou crescimento de tumor.

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O processo de regeneração óssea é um fenômeno altamente complexo que sofre a influência de diversos parâmetros. Avanços recentes nos modelos computacionais aliados ao emprego de novas abordagens experimentais como o uso da microfluídica têm contribuído no estudo da mecanobiologia e da migração celular. Contudo, há uma carência de trabalhos dedicados ao entendimento da influência de diversos fatores na migração celular relacionada à regeneração óssea, sobretudo na fase inicial que corresponde a inflamação.

Nesse sentido, é proposto um estudo, por meio de uma abordagem teórico-computacional, de modelos de migração celular em dispositivos de microfluídica. Esses modelos deverão contemplar diferentes combinações das propriedades físicas do substrato, variações no gradiente químico (como por ex. fatores de crescimento) bem como a aplicação de estímulos mecânicos. Esses modelos são importantes porque permitirão estudar sistemas baseados em microfluídica sem a necessidade de possuir os componentes físicos, entender os processos envolvidos no estudo da migração celular, prever as variáveis/fatores importantes, visando uma futura implementação experimental desses sistemas.

Esperamos contribuir para o entendimento das condições favoráveis para a migração de células envolvidas no processo da regeneração óssea. Esses dados poderão ser utilizados, por exemplo, no desenvolvimento de enxertos ósseos e aplicação de fatores bioquímicos que auxiliem e acelerem o processo de cicatrização.

4. REFERÊNCIAS

- ABHYANKAR, V.V et al. Human embryonic stem cell culture in microfluidic channels. In 7th INTERNATIONAL CONFERENCE ON MINIATURIZED CHEMICAL AND BIOCHEMICAL ANALYSIS SYSTEMS October 5-9, 2003, California USA. **Proceedings...** California: p. 17-20, 2003
- AMO, D.C et al. Quantification of angiogenic sprouting under different growth factors in a microfluidic platform. **Journal of Biomechanics**. v. 49, p. 1340-1346, 2016.
- ANANTHAKRISHNAN R, EHRLICHER A. The Forces Behind Cell Movement. **International Journal of Biological Sciences**. v. 3, n 5, p. 303-317, 2007
- ANDERSON, D. D. et al. Computational techniques for the assessment of fracture repair. **Injury**. v. 45, p.23-31, jun. 2014. doi.org/10.1016/j.injury.2014.04.005
- ANUSER, G.; ALLARD, J.; MOGILNER, A. Mathematical Modeling of Eukaryotic Cell Migration: Insights Beyond Experiments. **Annual Review Of Cell And Developmental Biology**. v. 29, n. 1, p.501-528, 6 out. 2013. doi.org/10.1146/annurev-cellbio-101512-122308.
- BERSHADSKY, A. D.; KOZLOV, M. M.. Crawling cell locomotion revisited. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**. v. 108, n. 51, p. 20275-20276, 9 dez. 2011. doi.org/10.1073/pnas.1116814108
- BETTS, D.C.; MÜLLER, R. Mechanical regulation of bone regeneration: theories, models, and experiments. **Frontiers in Endocrinology**. v. 5, p. 1-14, 2014.
- BONAFEDE, M.; ESPINDLE, D.; BOWER, A.G. The direct and indirect costs of long bone fractures in a working age US population. **Journal Of Medical Economics**. v. 16, n. 1, p.169-178, 2012. doi:10.3111/13696998.2012.737391.
- BORAU, C; KAMM, R D; GARCÍA-AZNAR, J M. Mechano-sensing and cell migration: a 3D model approach. **Physical Biology**. v. 8, n. 6, p.1-13, 25 nov. 2011. doi.org/10.1088/1478-3975/8/6/066008
- BORGIANI E.; DUDA G.N.; CHECA S. Multiscale Modeling of Bone Healing: Toward a Systems Biology Approach. **Front. Physiol**. v.8, 2017. doi: 10.3389/fphys.2017.00287
- CHOI, JONG-RYUL et al. Microfluidic assay-based optical measurement techniques for cell analysis: A review of recent progress. **Biosensors And Bioelectronics**. v. 77, p. 227-236, mar. 2016. doi.org/10.1016/j.bios.2015.07.068
- DOBLARÉ, M.; GARCÍA, J.M.; GÓMEZ, M.J. Modelling bone tissue fracture and healing: a review. **Engineering Fracture Mechanics**. v. 71, n. 13-14, p. 1809-1840, set. 2004. doi.org/10.1016/j.engfracmech.2003.08.003.

- DRISCOLL, M.K.; DANUSER, G. Quantifying Modes of 3D Cell Migration. **Trends In Cell Biology**. v. 25, n. 12, p.749-759, 2016. doi.org/10.1016/j.tcb.2015.09.010.
- GERIS, L.; SLOTEN, J.V.; van OOSTERWYCK, H. In silico biology of bone modelling and remodelling: regeneration. **Philosophical Transactions Of The Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences**. v. 367, n. 1895, p.2031-2053, 19 abr. 2009. doi.org/10.1098/rsta.2008.0293.
- GHIASI, M.S et al. Bone fracture healing in mechanobiological modeling: A review of principles and methods. **Bone Reports**. v. 6, p. 87-100, 2017. doi:10.1016/j.bonr.2017.03.002
- GIORGI, M.; VERBRUGGEN, S.W.; LACROIX, D. In silico bone mechanobiology: modeling a multifaceted biological system. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine**. v. 8, n. 6, p. 485-505, 7 set. 2016. doi.org/10.1002/wsbm.1356.
- HE, ZIYI; LIN, JIN-MING. Recent Development of Cell Analysis on Microfluidics. In: Lin, J.M.(eds). **Cell Analysis on Microfluidics. Integrated Analytical Systems**. Springer, Singapore, 2017. cap. 2, p.43-93
- JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Histologia Básica. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 524 p
- MAHESH, K.; SRAVANTI V. Microfluidics: a boon for biological research. **Current Science**. v. 112, n 10, 2017.
- MARSELL, R.; EINHORN T. A. The biology of fracture healing. **Injury**, v. 42, p. 551-555, 2011.
- MENON, N.V et al. Microfluidic Assay To Study the Combinatorial Impact of Substrate Properties on Mesenchymal Stem Cell Migration. **Applied Materials & Interfaces**. v. 7, p. 17095-17103, 2015. doi: 10.1021/acsami.5b03753.
- PAUL, C.D.; MISTRIOTIS, P.; KONSTANTOPOULOS, K. Cancer cell motility: lessons from migration in confined spaces. **Nature Reviews Cancer**. v. 17, n. 2, p. 131-140, 2 dez. 2016. Springer Nature. doi.org/10.1038/nrc.2016.123.
- PIVONKA, P.; DUNSTAN, C.R. Role of mathematical modeling in bone fracture healing. **Bonekey Reports**, v. 1, p.1-10, 14 nov. 2012. doi:10.1038/bonekey.2012.221.
- RINGER, P. et al. Sensing the mechano-chemical properties of the extracellular matrix. **Matrix Biology**. p.1-11, abr. 2017. doi.org/10.1016/j.matbio.2017.03.004.
- ROSA, N. et al. From mechanical stimulus to bone formation: A review. **Medical Engineering & Physics**. v. 37, n. 8, p.719-728, ago. 2015. doi.org/10.1016/j.medengphy.2015.05.015
- SATHYENDRA, V; DAROWISH, M. Basic Science of Bone Healing. **Hand Clinics**. v. 29, n. 4, p.473-481, nov. 2013. doi:10.1016/j.hcl.2013.08.002.
- SCHLUNDT, C. et al. Immune modulation as a therapeutic strategy in bone regeneration. **Journal Of Experimental Orthopaedics**. v. 2, n. 1, p.1-10, 7 fev. 2015. Springer Nature. doi.org/10.1186/s40634-014-0017-6.
- SOMAWEERA, H.; IBRAGUIMOV, A.; PAPPAS, D. A review of chemical gradient systems for cell analysis. **Analytica Chimica Acta**. v. 907, p.7-17, fev. 2016. doi.org/10.1016/j.aca.2015.12.008.
- SUN, M.; ZAMAN, M.H. Modeling, signaling and cytoskeleton dynamics: integrated modeling-experimental frameworks in cell migration. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine**. v. 9, n. 1, p.1-13, 2017. doi.org/10.1002/wsbm.1365
- TORRES, L.A. G. et al. Influence of the frequency of the external mechanical stimulus on bone healing: A computational study. **Medical Engineering & Physics**. v. 32, n. 4, p. 363-371, 2010. doi:10.1016/j.medengphy.2010.01.010
- TORTORA, G. J.; DERRICKSON, B. Principles of Anatomy and Physiology. 12. ed. John Wiley & Sons, Inc., 2009.
- WHITESIDES, G.M. The origins and the future of microfluidics. **Nature**. v. 442, n. 7101, p. 368-373, 27 jul. 2006. doi.org/10.1038/nature05058.

5. AGRADECIMENTOS

Aos órgãos de fomento (FAPEMIG, CNPq e CAPES) pelo apoio financeiro, à FEMEC/UFU ao LPM/UFU e a UFVJM.

6. RESPONSABILIDADE PELAS INFORMAÇÕES

Os autores são os únicos responsáveis pelas informações incluídas neste trabalho.