

Resumo

A Reconstrução de defeitos ósseos é considerada um problema maior em ortopedia, e a investigação nesta área mantêm-se activa, a nível clínico e fundamental. Recentemente, têm-se vindo a empregar esforços no sentido de se desenvolverem materiais injectáveis que possam ser implantados de uma forma minimamente invasiva. Deste modo, é possível diminuir o desconforto para o paciente bem como os custos associados ao procedimento, e promover uma recuperação mais rápida. A eficácia destes materiais poderá ser melhorada se lhes forem associados agentes terapêuticos adequados, que uma vez libertados localmente no defeito ósseo irão acelerar a sua regeneração.

Materiais sob a forma de pequenas partículas têm sido usados como injectáveis. O tamanho e formato das micropartículas ditam o modo como estas se organizam espacialmente no interior da cavidade, influenciando o processo de formação de novo osso. Vários estudos sugerem que partículas esféricas com uma distribuição de tamanhos apertada apresentam vantagens relativamente a outro tipo de partículas.

O objectivo principal deste trabalho foi desenvolver micropartículas esféricas, de tamanho uniforme, para serem usadas como material de preenchimento de defeitos ósseos e como veículos de enzimas. Especificamente, estudou-se a sua aplicação como um método terapêutico adjuvante para o tratamento de lesões ósseas associadas à doença de Gaucher. Por esse motivo, as microesferas foram utilizadas na imobilização da enzima recombinante glucocerebrosidase (GCR), actualmente utilizada no tratamento desta doença.

Como ponto de partida, utilizou-se alginato como uma matriz modelo para a imobilização da enzima. Microesferas com um tamanho uniforme contendo a enzima foram preparadas utilizando a técnica de extrusão gota-a-gota seguida de gelificação na presença de Ca^{2+} . A

enzima reteve a totalidade da sua actividade biológica e a sua estabilidade a pH fisiológico foi melhorada. O perfil de libertação da GCR caracterizou-se por uma etapa inicial de libertação rápida, seguida de uma etapa de difusão muito lenta. Foram realizados estudos in vitro utilizando fibroblastos de Gaucher com uma actividade da GCR endógena inexistente ou residual. A enzima libertada foi internalizada pelas células, resultando num aumento significativo da actividade enzimática intracelular.

Por forma a modelar a cinética de libertação da GCR e, simultaneamente, melhorar a adesão celular às microesferas de alginato, foram adicionados fosfatos de cálcio (hidroxiapatite, HAp; ou fosfato misto de cálcio e titânio, CTP) ao polímero.

Microesferas de fosfato de cálcio/alginato foram preparadas usando a técnica anteriormente descrita. A enzima GCR foi incorporada nestas microesferas de dois modos:

pré-adsorvida aos pós cerâmicos ou dispersa na pasta de polímero/cerâmico. As duas estratégias resultaram em perfis de libertação distintos, sendo o primeiro caracterizado por uma difusão mais gradual e uma diminuição da quantidade libertada na etapa inicial.

A adesão de osteoblastos a microesferas de fosfato de cálcio/alginato de diferentes composições foi analisada. A proporção cerâmico-polímero influenciou significativamente a percentagem de adesão e a morfologia das células. Só se observaram células esticadas e fusiformes em microesferas com elevadas percentagem de cerâmico.

Estes resultados sugeriram que microesferas compostas somente por fosfatos de cálcio poderiam ser adequadas para a aplicação pretendida. Microesferas de CTP e HAp foram obtidas por sinterização de microesferas de fosfatos de cálcio/alginato. Durante este processo o alginato é queimado e desaparece, ao mesmo tempo que os grânulos de cerâmico se unem, mantendo-se a forma esférica das micropartículas. As microesferas foram caracterizadas por diferentes técnicas e estudos in vitro revelaram que as mesmas podem ser usadas como suporte de cultura de osteoblastos.

A possibilidade de se associar, por adsorção, a enzima GCR às microesferas foi tida em consideração. Alguns aspectos fundamentais da interação da GCR com superfícies sólidas foram primeiro estudados usando superfícies modelo. Para isso utilizaram-se monocamadas auto estruturadas (SAMs) com diferentes grupos funcionais. Os efeitos da química da superfície e do pH da solução no processo de adsorção foram investigados. Dependendo das condições usadas, foi possível preservar a integridade da enzima e até melhorar a sua eficiência catalítica.

Ensaio preliminares mostraram que as microesferas de fosfatos de cálcio podem ser usadas para imobilizar a enzima GCR de um modo reversível, preservando a sua actividade biológica. A imobilização por adsorção constitui assim um método simples e eficiente de associar a enzima às microesferas e poderá permitir a sua libertação localizada em defeitos ósseos.

Abstract

Successful reconstruction of bone defects is a major concern in orthopaedic surgery and remains an active area of basic and clinical research. In recent years, increasing efforts have been devoted to the development of injectable materials that can be applied through minimally invasive surgery, providing less discomfort to patients, a faster recovery and lower costs. Their effectiveness can be improved through association with therapeutic agents, which may be locally released to accelerate the process of bone regeneration. Particle-based materials have already been used as injectable bone fillers. The size and shape of the particles dictate their spatial rearrangement within the cavity, playing a critical role in new bone formation, and it has been suggested that spherical-shaped particles with a narrow size distribution may present some advantages compared to other types of microparticles.

The main objective of this work was to develop microspheres with a uniform size, to be used as bone-defects fillers and as carriers for enzymes. As a specific application, the use of the system as an adjuvant therapeutic strategy to treat bone lesions associated with Gaucher disease (GD) was investigated, and microspheres were analysed as vehicles for the recombinant enzyme glucocerebrosidase (GCR), currently employed in its treatment.

As a starting point, alginate was used as a model-matrix for the entrapment of recombinant GCR. GCR-loaded microspheres with a uniform size were prepared by droplet extrusion and ionotropic gelation with Ca^{2+} . The enzyme retained full activity, and its stability at physiological pH was improved. GCR release profile was characterised by a high burst, followed by a stage of very slow release. The released enzyme was internalised by cultured GCR-deficient fibroblasts obtained from a GD patient, enhancing their residual enzymatic activity.

As a strategy to modulate GCR release-kinetics and at the same time improve cell adhesion to alginate microspheres, hydroxyapatite (HAp) or calcium titanium phosphate (CTP) were added to the polymeric matrix. Calcium phosphate-alginate microspheres were prepared, using the same technique. GCR was incorporated in the microspheres before gel formation in two different ways: pre-adsorbed onto the ceramic particles or dispersed in the polymeric/ceramic paste. The two strategies resulted in distinct release profiles, being the former characterised by a lower initial burst and a more gradual release.

Adhesion of osteoblastic-like cells to calcium phosphate-alginate microspheres of different compositions was analysed. The ceramic-to-polymer ratio strongly influenced the ability of cells to adhere and spread on the microspheres surface. Cells were only able to adopt a flattened morphology on microspheres with a high percentage of ceramic.

In view of these findings, microspheres composed only of calcium phosphate appeared to be suitable for the envisaged application. CTP and HAp microspheres were obtained by sintering calcium phosphate-alginate microspheres in order to burn-off the polymer and bond together the ceramic granules, while maintaining the spherical-shape of the particles. The microspheres were characterised using different techniques, and in vitro studies revealed that they can be used as supports for the culture of osteoblastic-like cells.

The possibility of coupling the enzyme GCR to CTP and HAp microspheres using adsorption as an immobilisation method was considered. In order to investigate some fundamental aspects of the interaction of recombinant GCR with solid surfaces, some mechanistic studies using self-assembled monolayers (SAMs) of different functionalities were used to investigate the effect of surface chemistry and solution pH on GCR adsorption behaviour. Depending on the conditions used for adsorption, the integrity of the enzyme could be preserved and in some cases its catalytic efficiency could even be improved.

Finally, some preliminary results indicate that calcium phosphate microspheres may be used to reversibly adsorb the enzyme while preserving its biological activity, and efficiently deliver it in vitro into GCR-deficient cells from GD type I patients. This suggests that physical adsorption of

GCR to calcium phosphate microspheres may provide a simple and efficient method to couple the enzyme to the microspheres, and may enable its localised delivery to bone defects.