

Novos biomateriais autólogos baseados em agregados plaquetários para bioengenharia e aplicações clínicas

BOLSISTA: Julya Vitória de Azevedo dos Santos

ORIENTADOR: Gutemberg Gomes Alves

Hospital Universitário Antônio Pedro (HUAP)

Niterói, agosto de 2024

Introdução

O desenvolvimento de biomateriais para a regeneração de defeitos ósseos críticos é um aspecto fundamental da bioengenharia de tecidos ósseos (KAČAREVIĆ et al., 2019). Esses materiais devem possuir características adequadas de rigidez, resistência e biocompatibilidade, além de serem bioativos, com propriedades que promovam a osseointegração e osteocondução para garantir sua eficácia nos enxertos ósseos (SANZ et al., 2019). No entanto, biomateriais sintéticos frequentemente apresentam alto custo e, em muitos casos, não conseguem replicar a estrutura do tecido nativo, o que reduz sua bioatividade. Portanto, o desenvolvimento de novos biomateriais é de particular interesse.

Agregados plaquetários, obtidos a partir da centrifugação do sangue periférico do próprio paciente, emergem como biomateriais promissores e clinicamente relevantes, por seu baixo custo, origem autóloga e propriedades intrínsecas que favorecem a regeneração tecidual (MIRON et al., 2017). A fibrina rica em plaquetas (PRF), uma evolução da primeira geração de agregados plaquetários, representa uma técnica simples e acessível que tem mostrado resultados positivos na clínica (DOHAN et al., 2006). Diferentes protocolos podem ser adotados para aprimorar as características da membrana PRF, incluindo a adição de componentes específicos. A inclusão de albumina sérica, por exemplo, pode conferir à membrana uma arquitetura mais estável, com menor degradação ao longo do tempo (GHENO et al., 2021). A adição de microesferas de carbonatoapatita nanoestruturada (nCHA), por outro lado, pode proporcionar uma estrutura altamente bioabsorvível, com bioatividade e osteocondutividade que se assemelham ao tecido ósseo nativo (CALASANS-MAIA et al., 2015).

Nesse contexto, este projeto propõe o desenvolvimento de duas membranas biológicas bioativas - PRF adicionada de albumina (Alb-PRF) e de microesferas de carbonatoapatita (Alb-PRF + nCHA) - e investigou seus efeitos biológicos sobre o comportamento de células ósseas de relevância para o reparo ósseo.

Metodologia

Membranas de Alb-PRF foram preparadas a partir de amostras de sangue de 10 doadores saudáveis, conforme o esquema da Figura 1, seguido da adição de microesferas de nCHA durante a polimerização para formar a membrana Alb-nCHA-PRF.

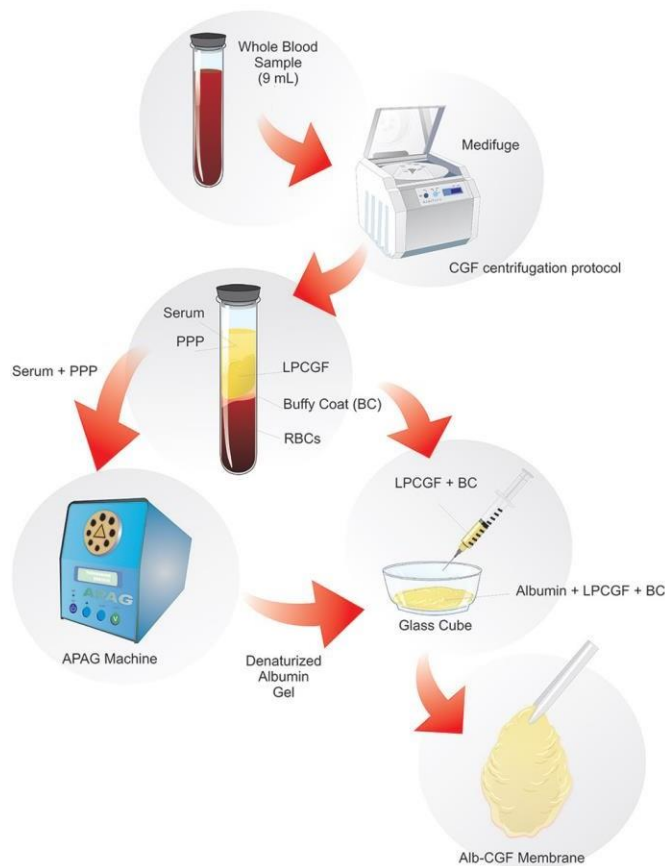


Figura 1. Protocolo de produção das membranas de Alb-PRF. Fonte: os autores.

A viabilidade, proliferação, mineralização e atividade da fosfatase alcalina de osteoblastos humanos MG63 expostos aos eluatos dessas membranas foram avaliadas. As amostras foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura (SEM) e a liberação de citocinas e fatores de crescimento foi quantificada. A análise estatística foi realizada usando o software Graphpad Prism 8.

Resultados

Uma avaliação multiparamétrica revelou que na membrana Alb- PRF houve liberação de fatores de crescimento como PDGF-BB e VEGF, assim como a liberação das citocinas IL-6 e IL-8. Já na membrana Alb-PRF+ nCHA, o PDGF-BB foi o fator de crescimento mais abundante, ao passo que as citocinas com maior concentração eram IL-8, RANTES e MCP-1. (Figura 2).

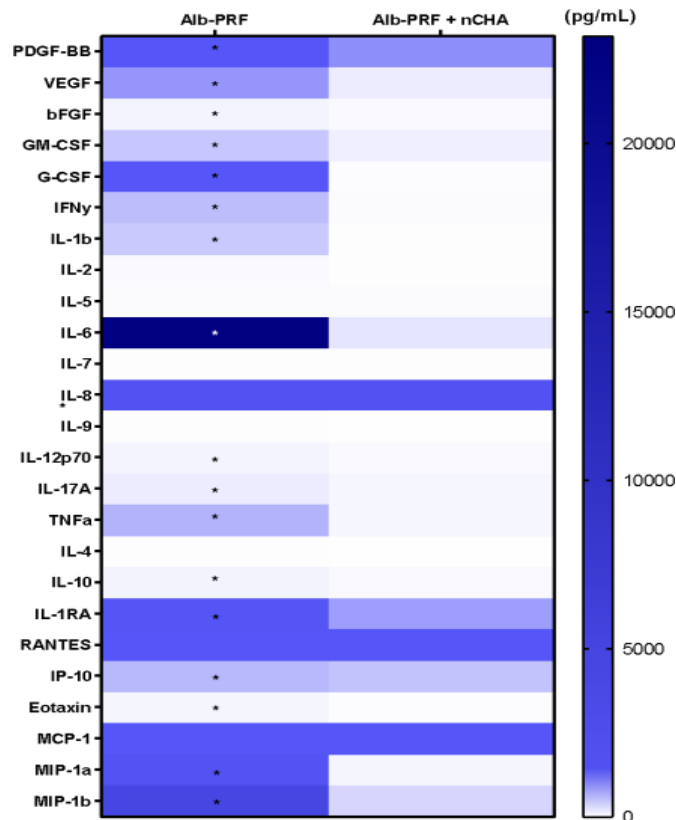


Figura 2: Heatmap das concentrações de 27 analitos dosados em meio de cultura de células, após a incubação das membranas Alb-PRF e Alb- PRF+ nCHA por 24h.

Os eluídos de 24 horas destas membranas foram usados para estimular a proliferação de osteoblastos humanos MG-63 por até 7 dias de tratamento (Figura 3). A partir do dia 3 de exposição aos eluídos, tanto o grupo Alb-PRF quanto o grupo Alb-PRF+ nCHA estimularam a proliferação celular comparado ao controle de meio.

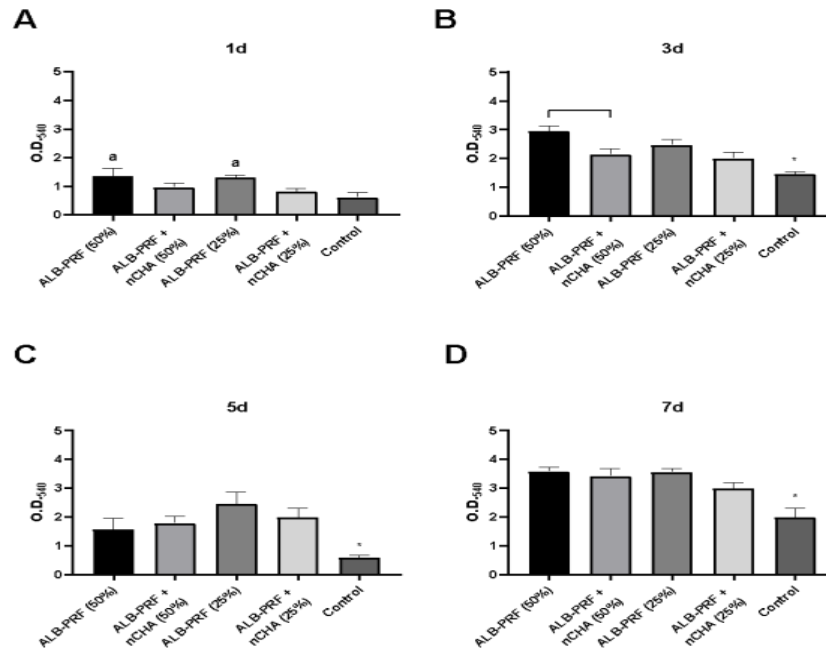


Figura 3: Proliferação de células MG63, por até 7 dias após exposição a extratos de ALB-PRF, ALB- PRF + nCHA, ou meio de cultura (controle). Um asterisco indica diferença significativa ($p < 0.05$) com relação a todos os outros grupos experimentais.

A capacidade dos biomateriais em estimular a biomineralização dos osteoblastos, foi avaliada com o corante vermelho de alizarina, capaz de marcar depósitos de cálcio (Figura 4). No tempo de 24 horas não houve diferença entre os grupos e o controle mas, a partir do dia 7, o grupo Alb-PRF apresentou maior potencial de biomineralização, tendência que se manteve ao longo dos demais tempos experimentais.

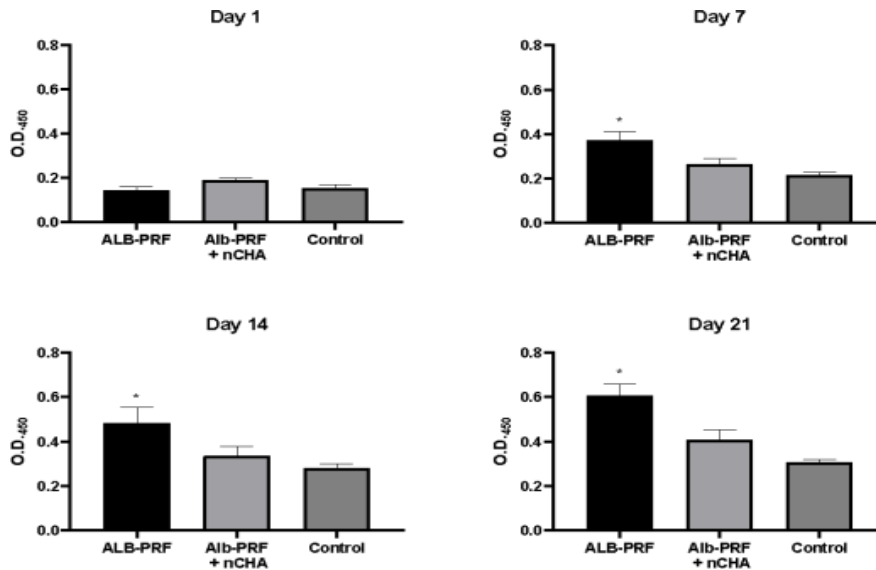


Figura 4. Biomimetic mineralization *in vitro* das células MG63 expostas por até 3 semanas ao eluído das membranas ALB-PRF ou ALB-PRF+ nCHA. Um asterisco indica diferença significativa ($p < 0.05$) com os outros grupos.

A fosfatase alcalina é uma enzima que atua no processo de mineralização e contribui também para a diferenciação de osteoblastos. A Figura 5 mostra que os maiores picos de atividade foram detectados para o grupo Alb-PRF, em todos os tempos experimentais a partir do sétimo dia de exposição.

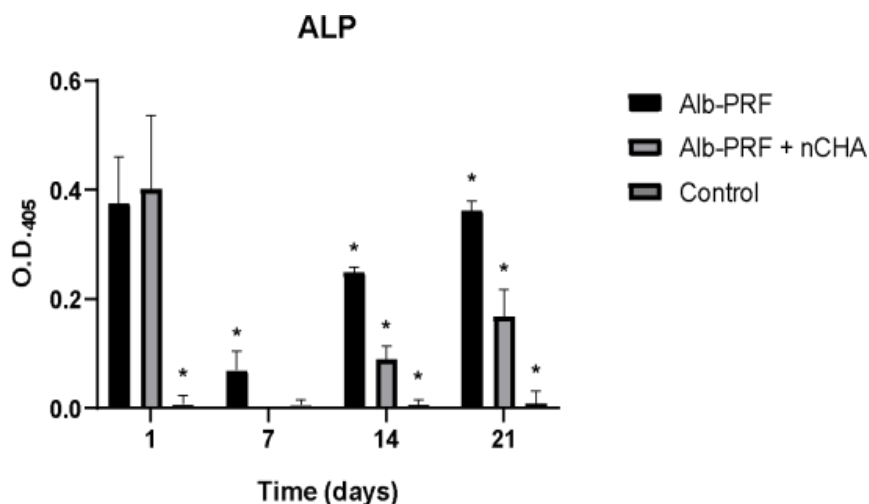


Figura 5: Avaliação da atividade da enzima fosfatase alcalina liberada por osteoblastos MG63 no meio de cultivo ao longo de 3 semanas de exposição aos biomateriais. Asteriscos indicam diferença significativa comparado a todos os outros grupos ($p < 0.05$).

Discussão

A associação entre membranas de fibrina rica em plaquetas enriquecidas com albumina desnaturada (Alb-PRF) e microesferas de hidroxiapatita carbonatada nanostruturada (ncHA) demonstrou uma modificação significativa na dinâmica de liberação de fatores de crescimento e citocinas, o que impactou diretamente o comportamento osteogênico das células MG63. A adição das microesferas de ncHA, embora tenha promovido uma estrutura tridimensional robusta, reduziu a liberação inicial de proteínas bioativas, resultando em uma diminuição na proliferação celular, mineralização e atividade de fosfatase alcalina em comparação com a Alb-PRF isolada. Esses achados sugerem que a alta capacidade de adsorção proteica das microesferas de ncHA pode ter interferido na disponibilidade imediata de mediadores biológicos cruciais para a regeneração óssea, comprometendo os efeitos esperados da Alb-PRF nas fases iniciais do processo osteogênico.

Apesar disso, observou-se que a liberação de fatores de crescimento pelas membranas Alb-ncHA-PRF aumentou ao longo do tempo, embora ainda inferior à Alb-PRF sem ncHA. Esse padrão sugere que os efeitos biológicos dessa combinação podem ser mais pronunciados em tempos mais longos, o que aponta para a necessidade de investigações adicionais para otimizar a solubilidade e a taxa de bioresorção do material. Esse entendimento poderá proporcionar melhorias no design de biomateriais que maximizem a eficácia na regeneração óssea, particularmente em cenários onde o controle da liberação de fatores de crescimento e a manutenção da estrutura tridimensional são cruciais.

Do ponto de vista clínico, a Alb-PRF se mostra promissora como uma membrana reabsorvível para regeneração óssea guiada (GBR), devido à sua capacidade de liberar gradualmente fatores de crescimento e fornecer uma estrutura biocompatível que facilita a reparação tecidual. Já a combinação de Alb-PRF com microesferas de carbonatoapatita pode ter um papel importante na recuperação de defeitos ósseos críticos, oferecendo um suporte estrutural adicional que pode ser particularmente útil em contextos onde a regeneração óssea necessita de uma base tridimensional estável. Estudos clínicos preliminares já apontam o desempenho interessante dessas membranas na regeneração tecidual, destacando seu potencial como uma alternativa eficaz aos materiais tradicionais utilizados em procedimentos de GBR e reparo de defeitos ósseos, e sugerem que otimizações futuras poderão ainda mais maximizar seu impacto terapêutico.

Conclusão

Foi possível desenvolver biomateriais com capacidade de liberar importantes mediadores biológicos como fatores de crescimento e citocinas, atuando de modo positivo no comportamento de células ósseas, incluindo estímulo à proliferação e diferenciação in vitro. Estes resultados abrem caminho para ensaios pré-clínicos e clínicos que possam comprovar a segurança e eficácia destes biomateriais.

Referências

CALASANS-MAIA, M. D. et al. Cytocompatibility and biocompatibility of nanostructured carbonated hydroxyapatite spheres for bone repair. *Journal of Applied Oral Science*, v. 23, n. 6, p. 599-608, 2015.

DOHAN, D. M. et al. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part I: technological concepts and evolution. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics*, v. 101, n. 3, p. e37–e44, 2006.

GHENO, E. et al. In vivo evaluation of the biocompatibility and biodegradation of a new denatured plasma membrane combined with liquid PRF (Alb-PRF). *Platelets*, v. 32, n. 4, p. 542-554, 2021.

MIRON, R. J. et al. Use of platelet-rich fibrin in regenerative dentistry: a systematic review. *Clinical Oral Investigations*, v. 21, n. 6, p. 1913–1927, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00784-017-2133-z>.

PERIĆ KAČAREVIĆ, Željka et al. An introduction to bone tissue engineering. *The International Journal of Artificial Organs*, v. 43, n. 2, p. 69-86, 2020.

SANZ, M. et al. Biomaterials and regenerative technologies used in bone regeneration in the craniomaxillofacial region: Consensus report of group 2 of the 15th European Workshop on Periodontology on Bone Regeneration. *Journal of clinical periodontology*, v. 46, p. 82-91, 2019.