

Contribuição ao estudo da proteína morfogenética óssea

Contribution to the study of bone morphogenetic proteins

Josimário João da Silva*¹
Bruno Cezar Campos Farias Pereira**
Maria Amélia Cordeiro Barros Neta**

RESUMO

Os autores apresentam uma revisão atualizada sobre proteínas reguladoras de formação óssea e de cartilagem in vivo. A reconstrução tecidual devido a processos patológicos como trauma e neoplasias é o grande desafio das cirurgias ortopédicas e buco maxilo faciais. O emprego na clínica cirúrgica desse biomaterial vem promover um grande benefício, mas demanda de mais pesquisas sobre a natureza da osteogênese.

UNITERMOS

Biomateriais, proteína morfogenética óssea, osteoindução

INTRODUÇÃO

Com o advento da tecnologia do DNA recombinante e a possibilidade da produção das proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) em larga escala, sem necessidade de uma fonte doadora, a técnica de enxertos ósseos ganhou um poderoso aliado.

O osso é um tecido conjuntivo que apresenta alta capacidade de reparação espontânea depois de lesado, após um intervalo de tempo. Porém, em certas situações, uma perda excessiva pode determinar o aparecimento de defeitos ósseos permanente.

Nas lesões císticas e neoplásicas que resultam na formação de loja óssea, o epitélio e/ou tecido conjuntivo suprajacentes podem migrar para dentro da cavidade impedindo a formação do coágulo e consequentemente do calo ósseo. As células do tecido mole proliferam mais rapidamente que os osteócitos, ocupando o defeito ósseo. Esses defeitos ósseos, requerem técnicas de tratamento como o uso de membranas e/ou enxertos ósseos autógenos.

Com a descobertas das BMPs o reparo ósseo pode ser realizado por meio de processo biológico natural.

REVISÃO DA LITERATURA

URIST (1971) foi o primeiro a identificar a BMP como proteína que induzia formação óssea em locais ectópicos. Ele descobriu uma substância na matriz óssea desmineralizada de coelhos que apresentava a propriedade de induzir células

mesenquimais indiferenciadas em células progenitoras.

De acordo com REDDI (1995), as BMPs fazem parte de uma superfamília chamada TGF- β , cujos membros apresentam propriedades regenerativas sobre diversos tecidos, incluindo o tecido ósseo.

SAMPATH e REDDI (1981) demonstraram um processo de extração de BMP conhecido como extração *dissociativa*. Por esse método, eles conseguiram extrair aproximadamente 3% de proteínas da matriz óssea desmineralizada. Foi demonstrado que os resíduos da matriz sozinhos não eram capazes de promover osteogênese, mas quando recombinados com os enxertos seu potencial osteoindutor era recuperado. Baseado nesta pesquisa, os autores constataram ser a BMP o princípio ativo do osso desmineralizado.

TAGA e MULATINHO (1999) afirmaram que o procedimento de extração dessas proteínas era extremamente exaustivo, onde cada etapa é realizada a 4° C, sendo extremamente baixa a quantidade de proteínas extraída. A partir de 100kg de osso cortical fetal bovino eram conseguidos apenas 20g de BMPs.

Para LEE (1997), a dificuldade de isolar e purificar a BMP, deve-se a pequena quantidade dessa proteína presente nos ossos quando comparadas a outras proteínas.

Segundo NUNES e DUARTE (1999), o método de purificação geralmente utilizado para a produção de BMPs em larga escala é extremamente caro, com isso, a possibilidade

de terapêutica do uso dessas proteínas se deve as técnicas da biologia molecular.

Até a década de 70, o DNA era o componente celular mais difícil de ser analisado. Sua sequência de nucleotídeos de enorme tamanho e monotonia química era geralmente analisada por meios indiretos, como a sequência de proteínas e análise genética. A partir da década de 70, novas tecnologias foram desenvolvidas permitindo o isolamento e a purificação de genes específicos num processo chamado de *clonagem gênica*. ESPREAFICO (1999).

A *Tecnologia do DNA recombinante*, é o conjunto de técnicas que é utilizado para estudar mecanismos de replicação e expressão gênica, na determinação da sequência de um gene e consequentemente da proteína que ele codifica, ou no desenvolvimento de culturas microbianas capazes de produzir substâncias úteis, tais como: insulina humana, hormônio do crescimento, vacinas e enzimas industriais em larga escala. ESPREAFICO (1999).

A técnica central da metodologia do DNA recombinante é a *clonagem molecular*, a qual consiste no isolamento e propagação de moléculas de DNA idênticas. A clonagem molecular compreende pelo menos dois estágios importantes: primeiro, o fragmento do DNA chamado *inserto* é ligado a uma outra molécula de DNA chamada de vetor para formar o *DNA recombinante*. No segundo estágio, a molécula do DNA recombinante é introduzida numa célula hospedeira compa-

¹ Prof. Adjunto de CTBMF da Universidade Federal de Pernambuco
Coordenador da Residência em CTBMF do Hospital da Restauração. Recife (PE)

** Alunos da Graduação em Odontologia da Universidade Federal de Pernambuco

tível, num processo denominado *transformação*. A célula hospedeira que adquiriu a molécula do DNA recombinante agora passa a ser denominada *transformante* ou *célula transformada*. WANG (1988).

WOZNEY (1988) obteve o clone molecular do DNA que codifica as proteínas recombinantes humanas BMP-1 (rhBMP-1), BMP-2 (rhBMP-2) e BMP-3 (rhBMP-3), determinando com isso, suas características bioquímicas e biológicas, inclusive suas seqüência de aminoácidos. A partir de então, outras BMPs foram isoladas.

De acordo com REDDI (1995), as BMPs fazem parte de uma superfamília de fatores de crescimento chamada TGF- β , cujos membros apresentam propriedades regenerativas sobre diversos tecidos.

WOZNEY (1995) isolou o clone do DNA que codifica oito proteínas individuais, BMP-1 a BMP-8. Examinando a relação entre elas, foi formulado uma classificação baseada em seus aminoácidos homólogos, sendo assim classificadas: subgrupo 1 formado pelas BMP-2 e BMP-4; subgrupo 2 formado pelas BMP-5, BMP-6, BMP-7 ou OP-1 e BMP-8 ou OP-2; subgrupo 3 formado pela BMP-3 ou osteogenina.

Esse mesmo autor, não considerou a BMP-1, devido sua seqüência de aminoácidos e por não possuir atividade osteoindutora.

Para LEE (1997), a vantagem de se usar proteínas morfogenéticas em relação aos outros fatores de crescimento, na técnica de reparo ósseo, é que não se torna necessário a preexistência de células osteoprogenitoras na região do implante.

TAGA e MULATINHO (1999), relatam que as BMPs são bastante solúveis, portanto devem ser ligadas a um *carreador*, o qual permitiria a conservação das BMPs por um tempo maior na cavidade óssea cirúrgica.

ASPENBERG et al. (1996), estudaram o uso de câmaras osteocondutoras de titânio associadas às BMPs, em ratos. Concluíram que houve um incremento na formação de tecido ósseo quando comparadas com o uso das câmaras sozinhas. Porém, os resultados foram menos expressivos quando comparados as fatores de crescimento associados à hidroxiapatita como carreador, sem o uso das câmaras.

JEPSSON e ASPENBERG (1996), em estudo realizado em coelhos, observaram que a BMP-2 podia inibir o reparo ósseo quando associadas à câmaras de titânio. A neoformação óssea foi deficiente e o crescimento tecidual no interior das câmaras foi pequeno. Os autores acreditam que tais fatos se devem ao menor tempo de meia vida da BMP-2 proporcionado pela câmara e pela presença do metal que circunda o material.

HERR et al. (1996), examinando a for-

mação ectópica de osso pelas BMPs, utilizando implantes de metal e cerâmica, observaram que a cerâmica era melhor carreador, pois apesar de possuírem uma menor área de superfície, induziram osteogênese na mesma quantidade que os implantes de titânio, que poderiam agir pela sua superfície metálica, de forma negativa através de suas forças iônicas. Os autores concluíram que as BMPs possuem atividade osteoindutora, e que esse processo pode ser influenciado pela natureza química do carreador.

LEE (1997), afirmou que a utilização de uma matriz não é essencial, porém proporciona grandes vantagens como a fixação da proteína no local de ação, definição da forma do osso resultante e a possibilidade de uma menor quantidade de BMP para que a dose seja efetiva.

NIMMI (1997), relatou que, devido sua sensibilidade às proteases endógenas, as BMPs têm de ser protegidas para que sejam liberadas de forma contínua no local do implante.

DISCUSSÃO

Quando URIST (1965) demonstrou que a matriz óssea desmineralizada induzia a formação de tecido ósseo em locais ectópicos, a terapia de enxertos ósseos adquiriu novos horizontes. Alguns pesquisadores antes dele já haviam descrito a idéia de osteoindução (HUGGINS, 1931 apud LIRA, 1998), mas foi o seu trabalho quem primeiro provou cientificamente que ela poderia ser um grande aliado na clínica cirúrgica. A possibilidade de neoformação óssea em locais onde não existiam previamente células osteoprogenitoras trouxe uma realista esperança de que reconstruções de grandes defeitos ósseos poderiam, no futuro, serem tratados.

Os outros anos de pesquisa foram dedicados ao isolamento do princípio ativo da matriz óssea desmineralizada, que URIST (1968) apud LIND (1998) denominou *Proteína Morfogenética Óssea* ou BMP (Bone Morphogenetic Protein).

URIST, MIKULSKI e LIETZE (1979) conseguiram isolar a proteína. Só que ainda existia um problema que dificultava a sua introdução na clínica. O método de extração e purificação das BMPs era bastante exaustivo e extremamente oneroso.

Foi quando WANG et al. (1988) apud LEE (1997), e WOZNEY¹ apud YOSHIDA (1999), em trabalhos distintos no mesmo ano, conseguiram, através do uso da tecnologia do DNA recombinante, solucionar o problema de produção e purificação em larga escala destas proteínas. WOZNEY, utilizando o trabalho de WANG como base, descobriu a seqüência do gene que codificava três pro-

teínas morfogenéticas ósseas (BMP-1, BMP-2 e BMP-3). Trabalhos posteriores foram feitos por WOZNEY (1995), e à família dessas três BMPs foram acrescentadas mais cinco, BMP-4 a BMP-8.

STONE (1997) afirmou que de posse desta técnica de produção, tornou-se possível fabricar a proteína em larga escala, sem necessidade de região doadora e praticamente livre de contaminação.

As BMPs mostraram sua potente ação osteoindutora promovendo formação óssea em locais ectópicos como demonstrado por ASPENBERG e TUREK (1996); HERR et al. (1996). OKUBO et al. (1999) mostraram que as BMPs, quando introduzidas no interior do músculo, estimularam a diferenciação tanto das células mesenquimais indiferenciadas como dos mioblastos em osteoblastos.

Elas provaram serem bastante efetivas tanto em defeitos cranianos (VILJANEM et al. 1977) como em defeitos mandibulares (YOSHIDA et al. 1999). OKUBO et al. (1999) demonstraram que sua ação em locais intra-ósseos foram ainda melhores que nas regiões ectópicas. ZELLIN e LINDE (1999) demonstraram a grande efetividade da rhBMP-2 na formação de tecido ósseo, aumentando em 100% a quantidade de osso formado com o uso de membranas, quando colocadas sobre crânio de ratos.

A dose ideal das BMPs ainda é uma interrogação. Estudos feitos por RUTHERFORD et al. (1993); RUTHERFORD et al. (1995); ASPENBERG e TUREK (1996) demonstraram que o efeito das BMPs foi diretamente proporcional a dose. SCHWARTZ et al. (1998) demonstraram que o osso desmineralizado seco-congelado induziu formação de tecido ósseo em menor quantidade que as BMPs. Como as proteínas são o princípio ativo do DFDBA, ele presumiu que a quantidade de BMP no DFDBA era menor que a dose disponível da proteína pura para uso terapêutico. Portanto, o acréscimo de BMP ao DFDBA poderia realçar a formação de tecido ósseo desse material, trazendo melhores resultados no tratamento. No entanto, o trabalho de ZELLIN e LINDE (1999) apresentou resultados diferentes, com a quantidade de tecido ósseo formada não sendo maior quando a dose de BMP era aumentada.

Um dos principais problemas na efetiva utilização dessas proteínas está na obtenção do veículo ideal. Carreadores de natureza química metálica são contra-indicados como demonstrado nos estudos feitos por ASPENBERG et al. (1996); JEPSSON e ASPENBERG (1996). HERR et al. (1996) presumiram que as forças iônicas do material podem influenciar na efetividade das

BMPs. A maioria das pesquisas utilizou o colágeno como carreador e vários autores, entre eles NIMMI (1997); LIND (1998); OKUBO et al. (1999), citaram este material como um dos melhores veículos para as proteínas.

DE LA FONTAINE e PINTO (1997) citaram que a antigenicidade do material é um fator que vai interferir nos seus efeitos, portanto o ideal seria que ele não apresentasse esta propriedade. TAGA e MULATINHO (1999) afirmam que, por apresentarem baixo peso molecular, as BMPs são totalmente livres de efeitos antigênicos.

ASPENBERG e TUREK (1996) mostraram que o efeito das BMPs foram diferentes em animais de diferentes espécies, portanto seus efeitos no organismo humano podem não ser tão evidentes como nos estudos "in vitro". Além do mais, KOBAYASHI et al. (1999) demonstraram que os mediadores da inflamação tiveram ação moduladora sobre a rhBMP-2, interferindo na ação da proteína. Apesar dos bons resultados, ainda temos que ser cautelosos quando da intenção de se escolher este material como terapia. A maioria dos trabalhos foram feitos em laboratórios, portanto sua efetividade "in vivo" ainda é uma interrogação.

CONCLUSÕES

As proteínas morfogenéticas do osso foram, sem dúvida, uma grande descoberta no tratamento de defeitos ósseos. Todos os trabalhos mostraram sua grande efetividade na osteoindução podendo, no futuro, serem largamente utilizadas na técnica de reparo ósseo.

São várias as vantagens de se utilizar as BMPs como biomaterial para enxertos ósseos:

a) não é necessária uma cirurgia adicional àquela do implante, como nos casos de enxerto autógeno. Com isso, diminui-se o trauma cirúrgico, o tempo de convalescência do paciente e os custos da operação;

b) não apresenta riscos de infecção cruzada. Nos enxertos alogênicos, a possibilidade de infecção cruzada é mínima mas existe. No caso das BMPs essa possibilidade é praticamente zero;

c) é totalmente reabsorvível no local, não sendo necessária uma segunda cirurgia para remoção do material;

d) apresenta potente ação osteoindutora, podendo, em defeitos extensos, levar a formação de osso não só nas bordas do defeito, mas em todas as regiões.

No entanto, o tecido ósseo formado pelas BMPs ainda não foi avaliado quanto a sua longevidade. Fica, então, a dúvida se esse osso formado é eficiente para suportar as forças funcionais a longo prazo.

Outro fator a ser destacado é o fato da

necessidade de um carreador. O veículo ideal ainda está para ser descoberto, e a utilização da matriz colágena como carreador aumenta a possibilidade de infecção cruzada.

Estudos "in vitro" são necessários no intuito de se revelar a dose ideal e o melhor veículo e estudos "in vivo" devem ser feitos e criteriosamente analisados para que sua real efetividade seja comprovada.

ABSTRACT

The authors make a present review about regulator proteins of cartilage and bone formation. The tissue reconstruction caused by pathologic processes like trauma and neoplasia are the great challenge of orthopaedic, oral and maxillofacial surgery. The use of this biomaterial in clinical surgery comes promote a great favour, but need more researchs about the nature of osteogenesis.

KEY WORDS

Biomaterial, bone morphogenetic proteins, bone induction

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASPENBERG, P.; TUREK, T. BMP-2 for intramuscular bone induction. **Acta Orthop Scand**; Copenhagen. v. 67, no. 1, p. 3-6, 1996.
- ASPENBERG, P. et. Bone graft proteins influence osteoconduction. **Acta Orthop Scand**; Copenhagen. v. 67, no. 4, p. 377-382, 1996.
- DE LA FONTAINE, J.; PINTO, A. V. S. O que devemos saber sobre osso desmineralizado seco-congelado? **Rev. Assoc. Paul. Cir. Dent**; São Paulo. v. 51, no. 6, p. 561-566, nov/dez, 1997.
- DONGIEUX, J. W. e cols. The effect of different membranes on onlay bone graft success in the dog mandible. **Oral Surg; Oral Med; Oral Pathol; Oral Radiol; Endod**; St. Louis. v. 86, no. 2, p. 145-151, aug, 1998.
- ESPREFICO, E. M. **Tecnologia do DNA Recombinante** [on line]. [capturado em 17 de dezembro de 1999]. Disponível na Internet via www.url: http://kathryn.fmrp.usp.br/td/.
- GIANNOBILE, W. V. e cols. Recombinant human osteogenic protein-1 (OP-1) stimulates periodontal wound healing in class III furcation defects. **J. Periodontol**; Chigago. v. 69, no. 2, p. 129-137, feb, 1998.
- HELDER, M. N. et al. Bone morphogenetic protein-7 (osteogenic protein-1, OP-1) and tooth development.

J. Dent. Res; Alexandria. v. 77, no. 4, p. 545-554, apr, 1998.

HERR, G. et al. Ectopic bone formation by composites of BMP and metal implants in rats. **Acta Orthop Scand**; Copenhagen. v. 67, no. 6, p. 606-610, 1996.

JEPSSON, C.; ASPENBERG, P. BMP-2 can inhibit bone healing. **Acta Orthop Scand**; Copenhagen. v. 67, no. 6, p. 589-592, 1996.

KOBAYASHI, M. et al. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 stimulates osteoblastic differentiation in cells isolated from human periodontal ligament. **J. Dent. Res**; Alexandria. v. 78, no. 10, p. 1624-1633, oct, 1999.

LEE, M. B. Bone morphogenetic proteins: background and implications for oral reconstruction. **J. Clin. Periodontol**; Copenhagen. v. 24, p. 355-365, 1997.

LIND, M. Growth factor stimulation of bone healing. **Act Orthop Scand**; Copenhagen. v. 69, suppl. 283, 1998.

NAKASHIMA, M. Induction of dentine in amputated pulp of dogs by recombinant human bone morphogenetic proteins-2 and -4 with collagen matrix. **Arch. Oral Biol**; Oxford. v. 39, no. 12, p. 1085-1089, 1994.

NIMMI, M. E. Polypeptide growth factors: targeted delivery systems. **Biomaterials**; Guildford. v. 18, n.º. 18, p. 1201-1225, 1997.

OKUBO, Y. et al. Comparative study of intramuscular and intraskeletal osteogenesis by recombinant human bone morphogenetic protein-2. **Oral Surg; Oral Med; Oral Pathol; Oral Radiol; Endod**; St. Louis. v. 87, no. 1, p. 34-38, jan, 1999.

REDDI, H. Bone morphogenetic proteins. **Adv of Dent Res**; Washington. v. 9, no. 3, p. 13, nov, 1995.

RUDKIN, G. H.; MILLER, T. A. Growth factors in surgery. **Plast. Reconstr. Surg**; Baltimore. v. 97, no. 2, p. 469-476, feb, 1996.

RUTHERFORD, R. B. e cols. Induction of reparative dentine formation in monkeys by recombinant human osteogenic protein-1. **Arch. Oral Biol**; Oxford. v. 38, no. 7, p. 571-576, 1993.

RUTHERFORD, R. B. et al. The time-course of the induction of reparative

dentine formation in monkeys by recombinant human osteogenic protein-1. **Arch. Oral Biol**; Oxford. v. 39, no. 10, p. 833-838, 1994.

RUTHERFORD, R. B. e cols. Transdental stimulation of reparative dentine formation by osteogenic protein-1 in monkeys. **Arch. Oral Biol**; Oxford. v. 40, no. 7, p. 681-683, 1995.

SAMPATH, T. K.; REDDI, A. H. Dissociative extraction and reconstitution of extracellular matrix components involved in local bone differentiation. **Proc. Nat. Acad. Scienc**; Washington. v. 78, p. 7599 - 7603, 1981.

SCHWARTZ, Z. et al. Addition of human recombinant bone morphogenetic protein-2 to inactive commercial human demineralized freeze-dried bone allograft makes an effective composite bone inductive implant material. **J. Periodont**; Chicago. v. 69, no. 12, p. 1337-1345, dec, 1998.

SIGURDSSON, T. J. et al. Periodontal repair in dogs: recombinant protein-2 significantly enhances periodontal regeneration. **J. Periodontol**; Chicago. v. 66, no. 2, p. 131-138, feb, 1995a.

STONE, C. A. A molecular approach to bone regeneration. **Br. J. Plast. Surg**; Edinburg. v. 50, p. 369-373, 1997.

TAGA, R. e cols. Reparo de defeito ósseo perene em crânio de cobaia pela aplicação de "osseobond". **Rev. Brasil. Implant**; Rio de Janeiro, ano 3, no. 1, p. 13-20, jan/fev, 1997a.

TAGA, E. M.; MULATINHO, J. Biomateriais para uso em clínica médico-odontológica. [on line]. [capturado em 17 de dezembro de 1999]. Disponível na Internet via [www.url:http://www.dentoflex.com.br/bmp.html](http://www.dentoflex.com.br/bmp.html).

URIST, M. R. Bone: Formation by Autoinduction. **Science**; London. v. 150, p. 893-899, 1965.

URIST, M. R. e cols. Purification of bovine bone morphogenetic protein by hydroxyapatite chromatography. **Proc. Nat. Acad. Scienc**; Washington, v. 81, p. 371-375, 1984.

URIST, M. R.; MIKULSKI, A.; LIETZE, A. Solubilized and insolubilized bone morphogenetic proteins. **Proc. Nat. Acad. Scienc**; Washington, v. 76, p. 1828-1832, 1979.

VILJANEN, V. V. et al. Low dosage of

native allogeneic bone morphogenetic protein in repair of sheep calvarial defects. **Int. J. Oral Maxillof. Surg**; Copenhagen, v. 26, no. 5, p. 389-393, oct, 1997.

YOSHIDA, K. et al. Enhancement by recombinant human bone morphogenetic protein-2 of bone formation by means of porous hydroxyapatite in mandibular bone defects.. **J. Dent. Res**; Alexandria, v. 78, no. 9, p. 1505-1510, september, 1999.

ZELLIN, G.; LINDE, A. Bone neogenesis in domes made of expanded polytetrafluorethylene: efficacy of rhBMP-2 to enhance the amount of achievable bone in rats. **Plast, Reconstr. Surg**; Baltimore v. 103, no. 4, p.1229-1237, apr, 1999.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA

Pós Graduação em Odontologia
Av. Prof. Moraes Rego, s/n. Cidade Universitária. Recife (PE)
Cep. 50. 670-901.