



Efeito das BMPs na regeneração óssea: mecanismo de acção e aplicação em Medicina Dentária

João Pedro Borges Catela dos Reis Sousa

Porto, 2011

Orientador: Germano Neves Pinto da Rocha

Co-Orientador: Pedro de Sousa Gomes

Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto
Rua Doutor Manuel Pereira da Silva, 4200-393 Porto
(+351) 220901100

Índice

Agradecimentos	3
Resumo	4
Abstract.....	5
Materiais e Métodos	6
Introdução.....	7
Desenvolvimento	8
Tecido ósseo	8
Remodelação óssea.....	9
Reparação óssea.....	9
Regeneração óssea	10
As BMPs	11
□ <i>Antagonistas</i>	16
□ <i>Co-receptores</i>	16
□ <i>Proteínas regulatórias intracelulares</i>	17
□ <i>Smads</i>	17
Estudos <i>in vitro</i>	18
Estudos <i>in vivo</i>	22
Ensaio clínico.....	26
Discussão	30
Conclusão	32
Bibliografia.....	33

Agradecimentos

Aos meus pais,
por terem permitido o meu percurso académico e pelo apoio incondicional.

Ao Professor Doutor Germano Neves Pinto da Rocha,
pela orientação do trabalho.

Ao Professor Doutor Pedro de Sousa Gomes,
Pelo apoio e dedicação prestados ao longo da elaboração do trabalho.

Resumo

O mecanismo de regeneração óssea e a sua integração na normal fisiologia do tecido ósseo têm sido intensamente investigados. Neste âmbito, na década de 1960, foram descobertas as BMPs (*Bone Morphogenetic Protein – Proteínas morfogénicas do osso*), pertencentes à superfamília TGF- β , revelando desde início grande potencial indutor da regeneração óssea. A sua aplicação em Medicina Dentária tem sido intensamente abordada e a sua abrangência tem-se revelado cada vez maior, assim como a complexidade inerente ao seu funcionamento.

No presente trabalho pretende estabelecer-se uma elucidação do seu mecanismo de acção, assim como uma breve referência a alguns processos e intervenientes na regulação da sua actividade biológica. Pretende-se também realizar uma exposição de estudos realizados *in vitro*, *in vivo* com recurso a modelos animais como ratinhos, ovelhas e cães, e finalmente ensaios clínicos realizados em pacientes humanos, numa tentativa de integração das suas propriedades e aplicações em Medicina Dentária.

Palavras-chave: Proteínas Morfogénicas do Osso, Regeneração Óssea, Medicina Dentária.

Abstract

The process of bone regeneration and its integration in the normal bone physiology have been intensely investigated. Accordingly, in the 1960's, the biological properties of BMPs (Bone Morphogenetic Proteins), members of the TGF- β superfamily, have been established within bone regeneration procedures. The application of BMPs in Dentistry has been greatly addressed and the functional extent of the BMPs has been increased over the years, as well as its complexity inherent to bone regeneration mechanisms.

The present work is intended to shed light on BMP function, as well as on some of the processes and participants in the regulation of their biological activities. Following, a presentation of studies developed *in vitro*, *in vivo* with rats, sheep and dogs, and finally clinical trials with human patients, in an attempt to integrate the BMP properties and applications in Dentistry, has been portrayed.

Key-words: Bone Morphogenetic Proteins, Bone Regeneration, Dentistry.

Materiais e Métodos

O presente trabalho resultou de uma pesquisa bibliográfica utilizando o motor de busca da base de dados “PUBMED”, de onde foram retirados os artigos referenciados, assim como uma pesquisa na Biblioteca da FMDUP, onde foram consultadas Teses de Mestrado e Teses de Doutorado, bem como livros referentes à área a ser abordada.

Na pesquisa online foram utilizados os termos de procura “BMP”, “*bone morphogenetic proteins*”, “*bone regeneration*”, “*BMP signalling*” para a pesquisa de artigos de revisão sobre o tema, tendo sido utilizados os termos “BMP”, “*bone morphogenetic protein*”, “*bone regeneration*”, “*dentistry*”, com aplicação de limites, numa primeira fase para artigos referentes a estudos *in vitro* publicados nos últimos 5 anos (todos os artigos referenciados foram publicados nos últimos 4 anos, à excepção de um artigo de 2000, incluído pela sua relevância), de seguida com limites aplicados para estudos *in vivo* publicados nos últimos 2 anos, e finalmente com limites aplicados para ensaios clínicos e relatos de casos em seres humanos publicados nos últimos 3 anos.

Introdução

O tecido ósseo e os mecanismos inerentes à sua fisiologia, quer se fale de mecanismos de remodelação ou regeneração, envolvem processos assentes num equilíbrio criado entre fenómenos de reabsorção e deposição óssea, mecanismos esses que são inexoravelmente indissociáveis de uma série de células, factores de crescimento e seus componentes agonistas e antagonistas, que no seu geral são regulados por uma complexa teia de mecanismos de *feedback* responsáveis pela regulação da transcrição génica.

No intuito de explorar o processo de regeneração óssea, nomeadamente no que concerne à actividade biológica das Proteínas Morfogénicas do Osso (*Bone Morphogenetic Proteins - BMPs*), é necessário compreender inicialmente a fisiologia óssea, como se processa a remodelação do tecido ósseo, bem como o processo de reparação/regeneração. Os mecanismos inerentes à actividade das BMPs serão abordados de forma mais extensa, como base para o entendimento dos recentes avanços que têm sido efectuados na área, a qual tem sofrido ao longo dos anos uma intensa investigação e avanço. Destacam-se os avanços na compreensão da regeneração óssea, associados ao desenvolvimento de novos materiais e métodos, disponíveis para a realização de procedimentos clínicos de regeneração óssea cada vez mais preditivos e efectivos.

Desenvolvimento

Tecido ósseo

O tecido ósseo é um tecido conjuntivo altamente vascularizado que fornece o suporte estrutural para os restantes sistemas e órgãos do organismo, sendo constituído por uma componente inorgânica que compõe 60% do seu peso, enquanto a componente orgânica corresponde a 30% do peso (em que 90% correspondem a colagénio e proteínas associadas ao colagénio e 10% correspondem a proteoglicanos e outras proteínas não-colagenosas) e 10% é água⁽¹⁾. A componente inorgânica é composta essencialmente por sais cristalinos, nomeadamente compostos de cálcio e fosfato, do qual a hidroxiapatite ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) se destaca como o mais abundante.⁽²⁾

Para além da estrutura da matriz extracelular, correspondente a 90% do tecido ósseo, os restantes 10% de volume são ocupados por diferentes populações celulares, que são responsáveis por toda a homeostasia óssea.^(2, 3) Destacam-se:

- Osteoblastos
 - São células diferenciadas, de baixa mobilidade, e são responsáveis pela síntese e deposição da componente orgânica da matriz extracelular, denominada osteóide, e pela sua subsequente mineralização (componente inorgânica). Depois de cumprida a sua actividade biológica, e com a diferenciação terminal, sofrem um de três destinos: apoptose, diferenciação em célula de revestimento, ou diferenciação em osteócito.
- Osteócitos
 - São o resultado do aprisionamento de osteoblastos em matriz extracelular mineralizada. Correspondem a cerca de 90% das células do tecido ósseo adulto e a sua quantidade está directamente relacionada com a unidade de volume ósseo. Têm funções importantes de mecano-recepção, manutenção da homeostasia mineral e sinalização biológica durante as diversas fases de remodelação.
- Células de revestimento
 - Caracterizam-se como osteoblastos inactivos, encontrando-se na superfície do tecido ósseo não sujeito a mecanismos de formação ou reabsorção óssea.

Podem ter papel importante na diferenciação de precursores osteoblásticos e na regulação da homeostasia mineral.

- Osteoclastos
 - São células responsáveis pelo processo de reabsorção óssea. Actuam através da libertação de substâncias ácidas que formam um microambiente onde é dissolvida a componente inorgânica do tecido ósseo e libertam enzimas que degradam as proteínas associadas à componente orgânica da matriz extracelular.

Remodelação óssea

O tecido ósseo encontra-se constantemente em processo de formação e reabsorção, num equilíbrio que se revela de crucial importância tanto para a manutenção da qualidade do tecido ósseo como para a homeostasia de outros elementos como o cálcio e fósforo, a nível sanguíneo. Verifica-se que o *turnover* ósseo – ciclo de reabsorção/formação - numa base anual para um adulto, se revela em valores de cerca de 4% para o osso cortical e cerca de 20% para o osso trabecular, em volume. Verifica-se que o equilíbrio conhecido como remodelação óssea é mantido essencialmente através do efeito catabólico dos osteoclastos na reabsorção óssea e do efeito anabólico dos osteoblastos na formação óssea.⁽²⁾ Todo este processo tem como objectivo a substituição de osso antigo por osso novo, de forma a manter as propriedades biomecânicas do tecido. Isto ocorre sem modificação de forma estrutural. O aparecimento de trabéculas ósseas e a sua orientação estão relacionados com a intensidade, duração e direcção das forças que se exercem sobre o osso através das inserções musculares, estimulando desta forma a actividade osteoblástica.⁽³⁾

O mecanismo de reabsorção óssea é despoletado quando as tensões mecânicas ou gravitacionais exercidas sobre o tecido ósseo são reduzidas, o que leva a um aumento da actividade osteoclástica, assim como, de forma oposta, quando o tecido ósseo é sujeito a forças de tensão constante, sofre aposição - um indicativo de aumento da actividade osteoblástica.⁽¹⁾

Reparação óssea

Após uma lesão do tecido ósseo, este inicia um processo de regeneração espontânea que, em situação fisiológica, vai resultar no restabelecimento da anatomia e função originais. Este processo compreende 4 fases que se sobrepõem: inflamação, formação de calo mole, formação

de calo duro e remodelação.⁽¹⁾ Forma-se inicialmente um hematoma na zona da fractura, o que resulta, seguidamente, no recrutamento de células inflamatórias como neutrófilos, macrófagos, monócitos, linfócitos, assim como células de outras linhagens, como fibroblastos e células endoteliais. Durante a fase inflamatória, estas células depositam uma matriz extracelular composta por colagénio tipo I, fibronectina, proteoglicanos, ácido hialurónico e colagénio tipo III, resultando na formação de tecido de granulação. Nesta fase o hematoma começa a ser reabsorvido e substituído por tecido vascular fibroso, enquanto ocorrem processos de neovascularização – formação do calo mole.

Posteriormente são recrutados osteoblastos que iniciam a deposição de osteóide, sendo também responsáveis pela sua subsequente mineralização; verificando-se o processo de ossificação de forma normal se os fragmentos de tecido ósseo se encontrarem correctamente fixados – formação do calo duro.

O processo de remodelação engloba a última etapa e caracteriza-se pelo restabelecimento da correcta forma, estrutura e função do tecido ósseo, com propriedades biomecânicas e biológicas idênticas às do tecido original.^(4, 5)

Regeneração óssea

Inicialmente, é necessário esclarecer quanto aos conceitos de reparação e regeneração tecidual, tratando-se o primeiro da restauração do tecido em si, sem que este retome a sua forma ou função originais, resultando em perda, maior ou menor, das suas propriedades. Por outro lado, o fenómeno de regeneração envolve a recuperação do tecido, retomando este as suas características originais, sem perda das suas propriedades fisiológica.⁽⁶⁾

A regeneração óssea depende de inúmeros factores, dentre os quais a existência de células osteogénicas precursoras, factores de crescimento e elementos osteoindutores – como, por exemplo, as BMPs - e de uma interacção adequada entre estes intervenientes. Adicionalmente são requeridas diversas condições/variáveis, tidas como essenciais para que o processo regenerativo ocorra adequadamente. Destacam-se a existência de uma vascularização adequada, estabilidade mecânica, dimensão crítica da área a regenerar e ausência de outras linhagens celulares proliferativas, que interfiram com o processo osteogénico.⁽⁶⁾

No mecanismo de regeneração óssea, é importante o conhecimento dos processos de osteoindução, osteocondução e osteopromoção (ou regeneração óssea guiada). Na **osteoindução** importa diferenciar entre células osteoprecursoras determinadas e induzíveis, localizando-se as primeiras na proximidade directa do osso, enquanto as segundas ocupam zonas mais afastadas do

tecido ósseo em si e encontram-se em estados de menor diferenciação. São desta forma sujeitas a factores indutores, como as BMPs, que agem como estímulo indutor da proliferação e diferenciação de células precursoras em osteoblastos - que iniciam por sua vez o processo de formação e deposição óssea. A **osteocondução** diz respeito ao fornecimento de uma estrutura ou matriz viável para que ocorra a deposição de novo tecido ósseo, sendo este fenómeno proporcionado por osso autólogo e uma série de biomateriais, de origem natural ou sintética. De entre as suas várias propriedades destaca-se a necessidade da sua estrutura interna e externa favorecerem o crescimento e deposição óssea e vascular, e a capacidade do material ser progressivamente reabsorvido e substituído por tecido ósseo neo-formado. A **osteopromoção**, ou regeneração óssea guiada, é uma forma de combater o facto de a regeneração óssea ser afectada pela competição estabelecida com células provenientes de tecidos com taxas de proliferação/regeneração mais elevadas, como o tecido conjuntivo fibroso ou o tecido muscular. Desta forma, há necessidade de proteger a zona que se pretende regenerar através do uso de barreiras físicas, de modo a que a região não seja invadida por células de alto poder regenerativo de tecidos que não se pretende regenerar primariamente. Pretende-se assim criar espaço para que a regeneração óssea tome o seu lugar, com crescimento de novos vasos sanguíneos e recrutamento de células osteoprecursoras, actuando a barreira como forma de promover a invasão selectiva da área em regeneração.^(7, 8)

As BMPs

Decorria a década de 1960 quando o trabalho de investigação do Dr. Marshall Urist sobre os sinais biológicos referentes ao processo de regeneração óssea o levou à descoberta de um extracto de proteínas do tecido ósseo desmineralizado que teriam a capacidade de induzir o processo de formação óssea em locais ectópicos. A actividade biológica destas proteínas foi confirmada em experiências com roedores, tendo este extracto proteico, daí em diante, sido designado como BMPs (*Bone Morphogenetic Proteins – Proteínas Morfogénicas do Osso*).⁽⁹⁾

Desde essa altura muito se tem intensificado na pesquisa sobre a estrutura molecular das BMPs e os seus mecanismos de sinalização, numa tentativa incessante de compreender de que forma estas actuam e como poderão estas proteínas ser utilizadas clinicamente para efeitos de regeneração óssea, de uma forma segura, rápida e predictiva. Toda esta pesquisa tem revelado resultados incríveis, elevando cada vez mais o entendimento sobre a complexidade de todo o processo de regeneração óssea dependente das BMPs, os seus agonistas, os seus antagonistas

e/ou inibidores, sendo desta forma possível avançar com metodologias cada vez mais avançadas e obtendo resultados cada vez mais satisfatórios.

As BMPs pertencem a um grupo mais vasto de proteínas denominado como superfamília TGF- β (*Transforming Growth Factor β – Factor de Crescimento Transformador β*) que compreende, além das BMPs, elementos como a própria TGF- β , activina e inibina. Para um normal processo de remodelação óssea, característico de um organismo em estabilidade fisiológica, é necessária a presença tanto das BMPs como dos seus antagonistas⁽¹⁰⁾, uma vez que as BMPs exercem o seu efeito através da indução em células osteoprecursoras para a sua proliferação e diferenciação, resultando em posterior formação de tecido ósseo. Como para a normal fisiologia óssea é necessário que ocorra um equilíbrio dinâmico e estável entre reabsorção e deposição óssea, as BMPs estão sujeitas a um controlo rigoroso por parte de agentes agonistas e antagonistas, o que impede que a sua acção seja exercida em demasia ou em défice. Os membros da família das BMPs são vários e as suas funções estão essencialmente relacionadas com a formação de osso e cartilagem, estando ainda envolvidos na embriogénese de vários outros sistemas, tais como o sistema cardíaco ou o reprodutor. No quadro elaborado por P. C. Bessa *et al* é possível observar as diferentes BMPs e as suas principais funções fisiológicas, assim como distinguir entre as que possuem um efeito mais acentuado a nível ósseo ou cartilagíneo.⁽¹¹⁾

BMP	Nomenclature	Main physiological roles	References
<i>Bone morphogenetic proteins</i>			
<u>BMP-2</u>	BMP-2a	Cartilage and bone morphogenesis/heart formation	Wang <i>et al.</i> , 1990a; Kang <i>et al.</i> , 2004; Callis <i>et al.</i> , 2005]
BMP-3	Osteogenin	Negative regulator of bone morphogenesis	Hino <i>et al.</i> , 2004
BMP-3b	GDF-10	Negative regulator of bone morphogenesis	Hino <i>et al.</i> , 2004
<u>BMP-4</u>	BMP-2b	Cartilage and bone morphogenesis/kidney formation	Luyten <i>et al.</i> , 1994; Kubler <i>et al.</i> , 1998a; Oxburgh <i>et al.</i> , 2005
BMP-5	–	Limb development/bone morphogenesis	Cho <i>et al.</i> , 2002; Zuzarte-Luis <i>et al.</i> , 2004
<u>BMP-6</u>	Vrg1, Dvr6	Hypertrophy of cartilage/bone morphogenesis/oestrogen mediation	Gitelman <i>et al.</i> , 1994; Rickard <i>et al.</i> , 1998; Kang <i>et al.</i> , 2004
<u>BMP-7</u>	OP-1	Cartilage and bone morphogenesis/kidney formation	Reddi, 1998; Kang <i>et al.</i> , 2004; Simic and Vukicevic, 2005
BMP-8	OP-2	Bone morphogenesis/spermatogenesis	Ozkaynak <i>et al.</i> , 1992; Zhao <i>et al.</i> , 1996; Cho <i>et al.</i> , 2002
<u>BMP-9</u>	GDF-2	Bone morphogenesis/development of cholinergic neurons/glucose metabolism	Chen <i>et al.</i> , 2003; Kang <i>et al.</i> , 2004; Lopez-Coviella <i>et al.</i> , 2006
BMP-11	GDF-11	Axial skeleton patterning/eye development/pancreas development/kidney formation	Esquela and Lee, 2003; Harmon <i>et al.</i> , 2004; Kim <i>et al.</i> , 2005; Andersson <i>et al.</i> , 2006
<i>Cartilage-derived morphogenetic proteins</i>			
BMP-12	CDMP-3, GDF-7	Ligament and tendon development/development of sensory neurons	Reddi, 2003; Lo <i>et al.</i> , 2005
BMP-13	CDMP-2, GDF-6	Cartilage development and hypertrophy	Reddi, 2003
BMP-14	CDMP-1, GDF-5	Chondrogenesis/angiogenesis	Yamashita <i>et al.</i> , 1997; Reddi, 2003; Zeng <i>et al.</i> , 2007
<i>Others</i>			
BMP-8b	OP-3	Spermatogenesis	Zhao <i>et al.</i> , 1996
BMP-10	–	Heart morphogenesis	Chen <i>et al.</i> , 2004
BMP-15	GDF-9b	Ovary physiology	Knight and Glister, 2006
BMP-16	Nodal	Embryonic patterning	Celeste and Murray, 1999
BMP-17	Lefty	Embryonic patterning	Celeste and Murray, 2000
BMP-18	Lefty	Embryonic patterning	Celeste and Murray, 2000

BMPs known to induce complete bone morphogenesis are underlined.

Tabela I. Membros da família das BMPs em humanos e suas principais funções fisiológicas (Fonte: Bessa *et al*⁽¹¹⁾)

Os membros da superfamília TGF- β são sintetizados sob a forma de grandes moléculas precursoras que posteriormente sofrem clivagem proteolítica, libertando assim a forma activa da proteína.⁽¹²⁾ As BMPs, em si, são constituídas por homodímeros ou heterodímeros ligados através de pontes dissulfídicas, sendo esta dimerização um pré-requisito para a formação óssea, encontrando-se activas tanto na forma homodimérica como na forma heterodimérica.^(11, 12) Embora ambas as formas se revelem activas, foi observado por Aono *et al* que a variante heterodimérica, em culturas celulares, revelava uma maior indução osteogénica, avaliada pela expressão de fosfatase alcalina (ALP – *Alkaline Phosphatase*) – um marcador do fenótipo osteoblástico – que a variante homodimérica.^(11, 13)

A inibição da actividade biológica das BMPs é conseguida através de uma série de factores, considerados como “*anti-BMP*”, de entre os quais se destacam os que activam a via de sinalização Wnt/ β -catenina, que induz a expressão de *chordin*, que por sua vez é um potente agente antagonista extracelular para as BMPs. Outra proteína, a *noggin*, é um potente agente antagonista extracelular responsável pela regulação da acção das BMPs.^(11, 14-16) Outros agentes inibidores da acção das BMPs referidos na literatura são a folistatina e a proteína *gremlin*⁽¹⁷⁾, tendo sido recentemente descobertos dois co-factores que actuam também na inibição das BMPs, o betaglicano e *crypto*.⁽¹¹⁾

Estruturalmente, as BMPs, como proteínas, possuem uma zona N-terminal, responsável pela sinalização do péptido, e uma zona C-terminal, assim como um pró-domínio que assegura a correcta configuração da proteína. A zona N-terminal é responsável pelo encaminhamento da BMP para a sua correcta via de sinalização.^(11, 14) A molécula activa é formada normalmente por homodímeros, embora possa ocorrer formação de heterodímeros, como BMP2/5, BMP2/6, BMP2/7 ou BMP2b/7, ocorrências essas verificadas *in vitro* e *in vivo*, e que aparentam ter maior capacidade de activação da sinalização, que os seus homólogos homodiméricos.^(12, 14)

A BMP é originada como uma molécula de grandes dimensões que sofre posteriormente clivagem para formar a forma dimérica madura da proteína com 25kD, que posteriormente é secretada.⁽¹⁰⁾ A clivagem da pro-proteína dá-se através de uma endoprotease de serina, verificando-se, no entanto, excepções como é o caso da BMP9, em que a pró-região se mantém anexada à proteína madura mesmo após a sua secreção, comprometendo assim a sua ligação ao receptor.⁽¹⁴⁾

O papel que as BMPs desempenham nas etapas de organogénese começou a tornar-se mais evidente e a sua compreensão aumentou com o advento da tecnologia molecular e genética. Entre outros avanços técnicos, a experimentação com ratos e ratazanas em que o gene codificante de uma determinada BMP era inviabilizado (“*gene knockout*”), levando a que essa

BMP não fosse expressa, permitiu observar o resultado da ausência de determinadas BMPs no desenvolvimento do organismo vertebrado. Na tabela seguinte (Tabela II) encontram-se resumidos alguns dos efeitos da ausência de BMPs específicas.⁽¹⁴⁾

Gene inviabilizado	Proteína	Resultado
bmp2	BMP2	Defeitos no desenvolvimento do aparelho cardíaco
bmp4	BMP4	Afecção dos fenómenos de gastrulação, formação da mesoderme, desenvolvimento do cristalino e emergência de células germinativas
bmp2/bmp4	BMP2/BMP4	Múltiplos defeitos em vários sistemas orgânicos, como sistema esquelético, ocular e cardíaco
bmp3	BMP3	Como se trata de uma BMP com efeito antagonista, a sua ausência provoca aumento da densidade mineral do osso
bmp5	BMP5	Aumento do crescimento da orelha, por perda da inibição da diferenciação de condrócitos proliferativos em células hipertróficas
bmp7	BMP7	Graves defeitos esqueléticos, renais e no desenvolvimento do olho
bmp8a, bmp8b	BMP8	Afecção da espermatogénese, resultando em infertilidade masculina
bmp15(gdf9b), gdf9	BMP15	Defeitos na folículo-génese ovariana, resultando em infertilidade feminina
bmp10	BMP10	Decréscimo drástico da proliferação de cardiomiócitos, reflectindo-se em defeitos de crescimento e desenvolvimento cardíacos

Tabela II. Efeitos biológicos do *knockout* das BMPs, em roedores. (Adaptado de: Sieber *et al*⁽¹⁴⁾)

Como outros membros da superfamília TGF- β , as BMPs exercem os seus efeitos através de distintas combinações com a ligação a receptores, do tipo I e tipo II, presentes na superfície

celular. Estes receptores, que se caracterizam por estarem associados a mecanismos de transdução do sinal dependentes de cinases de serina/treonina, englobam-se no sistema de sinalização que envolve os efectores nucleares denominados Smads.⁽¹⁶⁾

Existem seis receptores diferentes responsáveis pela ligação às BMPs, nomeadamente os enumerados na tabela seguinte:⁽¹⁴⁾

Receptor Tipo I	Receptor Tipo II
ActR1a (Activin Receptor Type Ia) / Alk2	BR11 (BMP Receptor Type II)
BR1a (BMP Receptor Type Ia)/Alk3	ActR11a (Activin Receptor Type IIa)
BR1b (BMP Receptor Type Ib)/Alk6	ActR11b (Activin Receptor Type IIb)

Tabela III. Receptores biológicos das BMPs. (Adaptado de: Sieber *et al*⁽¹⁴⁾)

Aquando do início do mecanismo de sinalização, forma-se um complexo heteromérico entre os dois tipos de receptores, numa acção concertada de modo a activar vias de sinalização específicas intracelulares.⁽¹⁴⁾ A cinase do receptor Tipo II encontra-se constitutivamente activa, sendo que a activação da cinase do receptor tipo I está dependente do ligando, oligomerização ligando-receptor e transfosforilação do seu domínio GS pelo receptor Tipo II, existindo homologia entre ambos os receptores e possuindo a capacidade de activar as vias de sinalização dependentes de Smads, entre outras.^(14, 16, 18) A região da cauda terminal do receptor é única dentro da superfamília TGF- β , e considera-se que é o facto determinante para a especificidade, complexidade e intensidade da sinalização das BMPs.⁽¹⁴⁾

As BMPs ligam-se com diferentes afinidades com os receptores Tipo I e II, o que provoca formas muito específicas de oligomerização, resultando na activação de diferentes vias de sinalização.^(11, 14, 16, 18) No entanto, a qualidade do ligando não é o único factor condicionante da oligomerização, sendo que a própria quantidade do ligando desempenha um papel preponderante, assim como os níveis de expressão dos receptores e co-factores, e presença ou ausência de complexos pré-formados Tipo I/Tipo II na superfície celular.⁽¹⁴⁾ Estas condicionantes são assim responsáveis pela enorme diversidade que caracteriza a sinalização através das BMPs.

A título de exemplo acerca da diversidade do processo de sinalização, pode ser referido o caso da BMP2, que pode ligar-se com alta afinidade ao receptor BR1a, sendo o receptor BR11 posteriormente recrutado, resultando na activação de uma via de sinalização não dependente de

Smads. Por outro lado, pode ligar-se a um complexo pré-formado BR1a/BR1I, resultando em activação de uma via de sinalização dependente de Smads.^(14, 19)

Todo o processo envolvendo as BMPs e as suas vias de sinalização são mecanismos altamente regulados, seja através de moléculas antagonistas, co-receptores, proteínas regulatórias intracelulares, entre outros.

▪ *Antagonistas*

Os antagonistas das BMPs são moléculas extracelulares que se ligam às BMPs, e impedem a sua interacção com os receptores. A sua síntese é, muitas vezes, o resultado de indução pela expressão das próprias BMPs, o que fornece prova da existência de um mecanismo de *feedback* local necessário para a modulação da actividade biológica destas proteínas.^(15, 20) A molécula *noggin* é um clássico antagonista BMP, cuja única função parece ser a ligação e inactivação da BMP-2, -4 e -7, envolvendo os epítomos responsáveis pela ligação aos receptores. Por outro lado a molécula *gremlin* é co-expressa com as BMPs e liga-se a estas proteínas, possuindo, no entanto, actividade celular independentemente da sua ligação às BMPs.⁽²¹⁾ A sua expressão é claramente detectável no esqueleto, o que faz dela um alvo para tratamento da osteoporose, por exemplo, já que a sua inibição resulta no aumento da formação óssea.^(14, 20) *Chordin* é outra molécula da mesma família que a *noggin*, que se liga às BMPs e modula a sua acção, e conjuntamente com a *noggin*, é essencial para um normal desenvolvimento facial e craniano.^(10, 22) O produto do gene *tsg* (*twisted gastrulation*) pode actuar como agente agonista ou antagonista da acção das BMPs, sendo que a sua sobre-expressão impede a diferenciação osteoblástica *in vitro*.^(20, 21)

A BMP3 é um produto derivado dos osteoblastos e armazenado na matriz óssea, agindo localmente de forma a bloquear a sinalização BMP através do receptor ActR1I e da inibina, antagonizando a actividade das BMPs na presença de betaglicano, por ligação ao receptor Tipo II, bloqueando a ligação da BMP.⁽⁹⁾

▪ *Co-receptores*

Caracterizam-se como moléculas que tipicamente interagem com as BMPs e com um ou ambos os receptores, de forma a potenciar ou a inibir a sinalização através de vias dependentes das Smads, em tecidos específicos. Entre os co-receptores potenciadores da sinalização BMP podem referir-se as moléculas guia repulsivas (RGM) a e c, *dragon* (RGMb), o receptor tirosina

cinase c-Kit, *endoglin* e betaglicano. Por outro lado, as BMPs são negativamente reguladas pelo receptor *decoy* BAMBI (*BMP and activin membrane-bound protein*), assim como pelas moléculas RTK, Ror2 e TrkC.⁽¹⁴⁾

- ***Proteínas regulatórias intracelulares***

A forma de oligomerização verificada a nível da interacção ligando-receptor permite que diferentes proteínas associadas ao receptor se integrem na via de sinalização de uma forma sequencial, sendo responsáveis pela direcção que a via de sinalização toma, ou seja, activação de vias dependentes ou independentes de Smads, por exemplo. Pode referir-se, a título de exemplo sobre a regulação intracelular de BMPs, o caso das fosfatases *Dullard* e PP2A. Embora ambas se liguem ao domínio cinase do receptor BRII, a proteína fosfatase *Dullard* antagoniza a sinalização BMP através da degradação dos receptores BRI e BRII marcando-os para degradação no proteossoma, enquanto a proteína fosfatase PP2A aumenta a intensidade da sinalização envolvendo Smads, por remoção da fosforilação do ligando das Smads.⁽¹⁴⁾

- ***Smads***

A ligação das BMPs aos seus receptores específicos pode resultar na activação de vias de sinalização independentes ou dependentes de Smads, podendo esta subclasse proteica ser dividida em R-Smad (*Smad regulada pelo receptor*), Co-Smad (*Mediador comum de Smad*) e I-Smad (*Smad inibitória*).^(10, 11, 14) Estas proteínas possuem dois domínios conservados: o domínio N-terminal MH1 e o domínio C-terminal MH2. O domínio MH1 é responsável pela ligação ao DNA e exhibe uma plataforma que permite a ligação a outras proteínas, enquanto o domínio MH2 intervém na especificidade das R-Smads, reconhecimento do receptor, importação para o núcleo, oligomerização da Smad e contém um segmento SXSS responsável pela fosforilação da zona C-terminal.⁽¹⁴⁾ As R-Smads, quando inactivas, apresentam os domínios MH1 e MH2 em interacção numa estrutura auto-inibitória, pelo que a fosforilação da zona C-terminal leva à activação da R-Smad e induz a libertação da estrutura auto-inibitória. Isto traduz-se pela exposição do sinal de importação nuclear, aumento da afinidade para a Smad4 (*Co-Smad*) - que forma um complexo com a R-Smad - permitindo a translocação do conjunto para o núcleo.⁽¹⁴⁾

No núcleo, o complexo supra-citado pode ligar-se a uma série de promotores para regular a transcrição de determinados genes específicos, numa acção concertada do complexo R-Smad/Co-Smad com co-repressores e co-activadores.^(9, 14)

As I-Smads competem com as R-Smads pela zona de ligação ao receptor BRI, podendo ainda formar um complexo não funcional com a Smad4 (reduzindo a sua disponibilidade). A Smad6 pode ainda inibir a sinalização das BMPs no núcleo, através da interacção com co-repressores do mecanismo transcricional, podendo afirmar-se que a zona de ligação da Smad representa uma plataforma de sinalização que permite a existência de *loops* de *feedback* auto-inibitórios e interacção com outras vias de sinalização.^(11, 14)

Além da clássica via de sinalização dependente de Smads, as BMPs são capazes de induzir a transcrição génica independentemente das Smads, tal como é disso exemplo o caso dos miRNAs (*micro-RNA*). Estas moléculas permitem a rápida regulação da expressão proteica em células em diferenciação, através da interacção com mRNA (utilizando mRNA pré-existente ou promovendo a libertação de mRNA previamente inacessível).^(14, 23-25)

No adulto as BMPs desempenham um papel primordial em diversos eventos biológicos, nomeadamente durante a formação óssea, cicatrização e angiogénese, sendo que hoje em dia são já uma ferramenta disponível para terapias regenerativas humanas, pelo que se reveste de grande importância o conhecimento dos mecanismos moleculares que regem a acção das BMPs. Acresce a importância do conhecimento das várias vias de sinalização, bem como da sua activação e manutenção, de forma a ser possível manipular essas mesmas vias com o propósito de promover a regeneração intencional e controlada dos tecidos biológicos. No âmbito deste trabalho focaliza-se o estudo da actividade biológica das BMPs no processo de regeneração óssea, através da análise crítica de estudos *in vitro*, *in vivo* e ensaios clínicos.

Estudos *in vitro*

Embora o papel das BMPs em processos regenerativos esteja bem estabelecido, a sua real aplicação em situação clínica ainda é causa de muito debate, essencialmente devido à constatação da sua curta semi-vida *in vivo* e da sua baixa actividade específica⁽²⁶⁾. Alguns autores defendem um uso mais selectivo e restrito das BMPs, especialmente o uso da BMP2, em casos de reconstrução de defeitos de continuidade mandibular, alertando para resultados clínicos e radiográficos aquém do esperado, na grande maioria das aplicações.⁽²⁷⁾ Seguindo essa linha de pensamento, torna-se necessário direccionar a pesquisa para linhas de desenvolvimento da entrega e rentabilização das BMPs compatíveis com uma dada situação clínica,⁽²⁸⁾ surgindo como objectivo a necessidade da retenção das BMPs no local-alvo através de adsorção, aprisionamento/imobilização, ou ligação covalente com o material regenerativo implantado.⁽²⁹⁾

A utilização de vários materiais tem sido testada ao longo dos anos e a engenharia de tecidos tem sido responsável pela apresentação de materiais cada vez mais compatíveis e adequados para o transporte de BMPs, bem como pela manutenção no local-alvo, podendo referir-se como exemplo a utilização de colagénio, polímeros sintéticos biodegradáveis, polímeros de origem natural, cerâmicos ou micropartículas/nanopartículas de diversos materiais.⁽²⁹⁾

De diversos trabalhos publicados, os resultados biológicos mais relevantes advêm geralmente da utilização combinada de diversos materiais que mimetizam a estrutura do tecido ósseo: relativamente à componente orgânica, são utilizados polímeros naturais (como o colagénio); e relativamente à componente inorgânica, são utilizados cerâmicos bioactivos (como os fosfatos de cálcio ou vidros bioactivos).

Num estudo desenvolvido por Bergeron *et al* foi desenvolvida e testada a eficácia de um sistema de *drug delivery* de BMPs recorrendo a um gel de colagénio tipo I em combinação com um biovidro (*Bioglass® microspheres*), de modo a avaliar a diferenciação de pré-osteoblastos MC3T3-E1. Foram avaliadas a BMP9 e a rhBMP2 (*recombinant human Bone Morphogenetic Protein – Proteína Morfogénica Óssea humana recombinante*), tendo sido verificado um efeito similar de ambas as proteínas num aumento significativo da actividade da ALP, sendo que a BMP9 induziu uma maior diferenciação celular, em comparação com a rhBMP2 (que revelou resultados não muito diferentes do grupo controlo), principalmente quando combinada com o sistema de entrega em estudo.⁽³⁰⁾

Outros métodos de *delivery* têm sido desenvolvidos. Recentemente, tem sido abordada uma tecnologia que não faz uso de membranas, barreiras físicas, ou materiais de preenchimento, mas sim de técnicas que induzem a expressão de BMPs através da introdução de vectores virais ou não-virais, que assim estimulam a produção de BMPs localmente. Kawai *et al*, num estudo de 2009, exploraram a expressão génica do heterodímero BMP2/7, utilizando um vector *cassette*, e recorrendo à proteína heterodimérica por revelar maior poder osteoindutivo que as respectivas proteínas homodiméricas isoladamente.⁽³¹⁾ Neste estudo foi verificado que o heterodímero BMP2/7 seria melhor utilizado numa fase inicial do tratamento para regeneração óssea pois o seu efeito é mais notório e significativamente mais elevado do que o dos seus homólogos homodiméricos quando se tem em consideração células osteogénicas imaturas ou células pluripotenciais indiferenciadas, pois nas células mais diferenciadas, como as células MC3T3-E1, a actividade da ALP observada foi idêntica à verificada com a utilização isolada de BMP2.⁽³¹⁾

Relativamente ao uso da terapia génica, o seu objectivo é o de alterar os níveis de moléculas regenerativas existentes naturalmente, de forma a induzir uma resposta terapêutica.

Para que esta abordagem seja realmente bem sucedida, é necessário que se verifiquem alguns parâmetros, nomeadamente: a utilização de um método eficiente de introdução dos genes em células-alvo locais, com a mínima resposta imune do hospedeiro; os genes transferidos devem ser expressos em nível adequado e durante tempo suficiente para produzirem uma resposta regenerativa, mas inactivos assim que esse objectivo é atingido; os vectores virais devem infectar as células de interesse de forma segura, com o mínimo de efeitos secundários⁽²⁶⁾

Uma das áreas em que o mecanismo de regeneração ou formação óssea se tem tornado muito importante é na cirurgia de implantes mais particularmente no fenómeno de osteointegração do implante, sendo que os eventos críticos associados a esse processo são influenciados pela superfície do implante, particularmente pela interface entre a componente celular e o implante.⁽³²⁾ Vlacic-Zischke *et al* abordaram esta questão, testando a influência que a microrrugosidade da superfície de titânio de um implante teria na sinalização BMP, entre outros factores de crescimento, utilizando para tal uma superfície com topologia rugosa (SLA – *sand-blasted acid-etched*) *versus* uma superfície com topologia rugosa e hidrofílica modSLA (superfície SLA, modificada pelo tratamento com N₂ e armazenamento em solução isotónica de NaCl).⁽³³⁾ Foi testada a expressão de BMP em ambos os grupos de estudo, assim como no grupo de controlo (sem criação de microrrugosidades ou tratamento hidrofílico), verificando-se um aumento significativo na expressão de BMP2 na cultura estabelecida na superfície de modSLA, não se verificando diferença significativa na expressão de BMP2 entre o grupo SLA e o grupo de controlo, como é visível na Figura I. A análise das várias vias de sinalização presentes revelou um aumento positivo na regulação da sinalização associada à BMP2 no caso do grupo modSLA, sendo que a expressão génica da BMP6 também foi aumentada, embora não pudesse ser quantificada devido ao método utilizado no estudo, demonstrando desta forma que a modificação da superfície, nomeadamente o tratamento levando a um aumento da hidroflicidade, resulta no aumento da diferenciação osteogénica de osteoblastos derivados do osso alveolar.⁽³³⁾

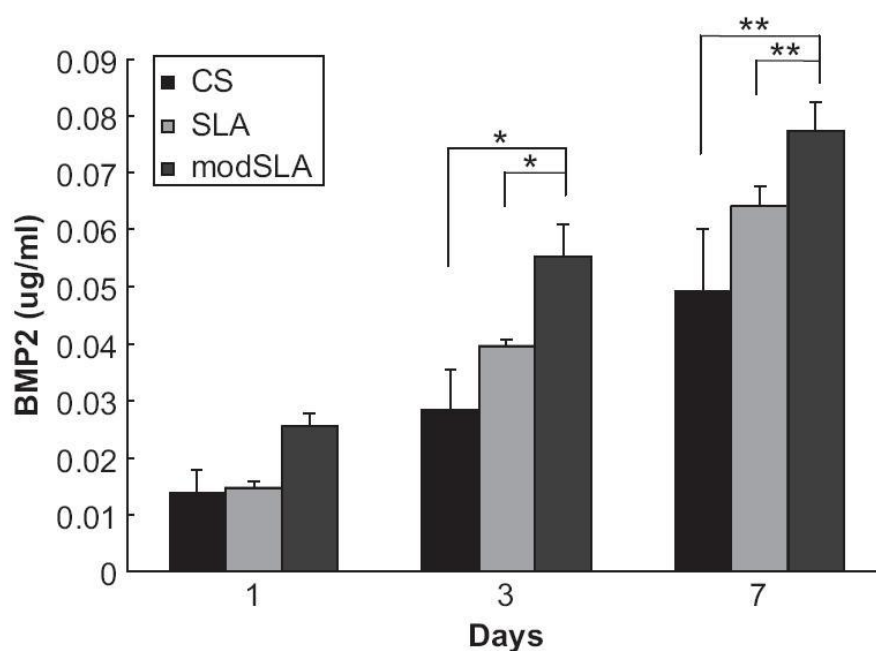


Figura I. Valores da expressão de BMP2 em cultura de células osteoblásticas, estabelecidas na situação controlo (CS), e na superfície das superfícies SLA e modSLA, durante 7 dias. (Adaptado de Vlacic-Zischke *et al*⁽³³⁾)

No âmbito da engenharia de tecidos craniofacial, para além dos osteoblastos, outras populações, nomeadamente de origem dentária têm demonstrado potencial aplicação. Verifica-se também que embora o mecanismo de dentinogénese pelo qual as células da polpa dentária são responsáveis, e o processo de osteogénese envolvendo osteoblastos e seus precursores sejam regulados por diferentes intervenientes, a semelhança na expressão génica de várias moléculas como a Sialoproteína Óssea, Fosfatase Alcalina, Colagénio Tipo I ou Osteocalcina, levanta a questão sobre o possível envolvimento de células da polpa dentária em processos de regeneração de tecidos duros envolventes.⁽³⁴⁾

Neste contexto, Tada *et al* exploraram a hipótese de um aumento no cálcio extracelular (Ca_0^{2+}) levar a um aumento na expressão génica de BMP2. Verificou-se que este aumento acontecia realmente e era selectivo, aumentando a expressão génica de BMP2 rapidamente nas primeiras 6 horas e gradualmente a partir daí.⁽³⁴⁾ Outra constatação deste estudo foi a de que os níveis de mRNA da BMP2 se encontrava também aumentado em células do ligamento periodontal numa forma dependente da dose aplicada, assim como em fibroblastos gengivais (embora de forma mais baixa), demonstrando que o aumento da sinalização de BMP2 é selectivo para determinados tipos celulares, como é demonstrado na Figura II.⁽³⁴⁾

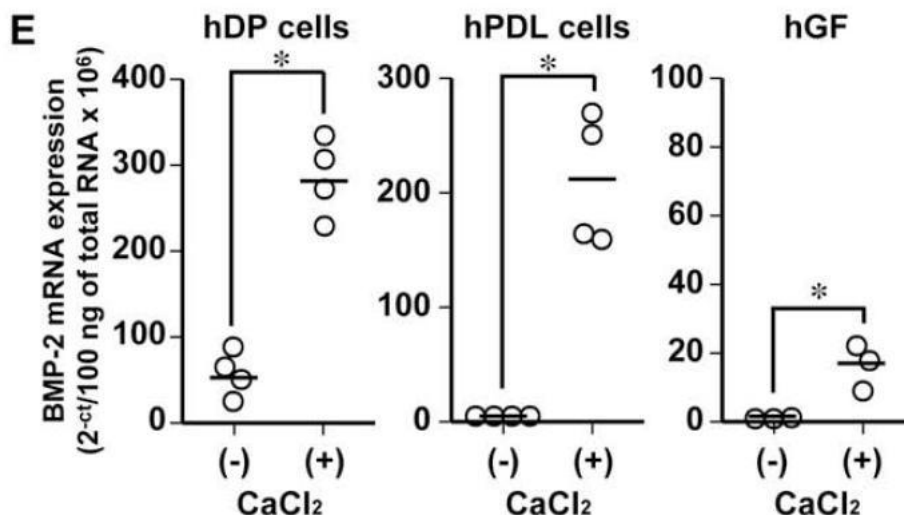


Figura II. Elevação da expressão de mRNA da BMP2 induzido por estimulação com concentração de 10 mM de CaCl₂ durante 6 horas (Fonte: Tada *et al*⁽³⁴⁾)

O aumento do mRNA de BMP2 é semelhante para as células da polpa dentária e para as células do ligamento periodontal, embora sejam processos regulados por receptores distintos, enquanto a sinalização nos fibroblastos gengivais se revelou bastante mais baixa, o que fornece indicação da capacidade osteogénica das células da polpa dentária e das células do ligamento periodontal face a uma falta dessa capacidade por parte dos fibroblastos gengivais, dando indicação de que este mecanismo é um candidato para futura investigação e desenho de terapias regenerativas de dentina e dos tecidos periodontais.⁽³⁴⁾

Estudos *in vivo*

Num estudo de 2010, Shin *et al* explorou a hipótese do uso de fibroblastos gengivais humanos geneticamente alterados de forma a produzirem BMP2, como forma de induzir regeneração óssea em defeitos criados em ratinhos, numa abordagem experimental. Verificou-se que o uso desta população celular era adequado devido ao elevado grau de sucesso na transfecção, à facilidade de acesso à população celular e a disponibilidade em quantidade adequada. Neste trabalho obtiveram-se diferenças estatisticamente significativas na formação de novo tecido ósseo usando BMP2/HGF em comparação com o uso de HGF isoladamente, fornecendo evidência da indução proeminente de regeneração óssea, *in vivo*, do conjunto BMP2/HGF.⁽³⁵⁾

Miyaji *et al*, num estudo utilizando cães de raça *Beagle*, testou a influência do condicionamento da superfície radicular com BMP2 e os efeitos que teria na regeneração de

defeitos de deiscência periodontal, aplicável particularmente em casos clínicos de periodontite grave. Verificou-se que esse condicionamento com BMP2 resultava na deposição de um tecido semelhante a cimento na superfície radicular e inibia o crescimento epitelial de direcção apical, com a possibilidade de formação de anquilose apical, sugerindo que a aplicação de BMP2 na superfície radicular promoveria o restabelecimento de junção em casos de destruição periodontal avançada.⁽³⁶⁾

	Control (n = 8)	0.4 µg/µL BMP-2 (n = 6)	1.0 µg/µL BMP-2 (n = 7)
Cementum-like tissue (mm)	0.00 ± 0.00	0.17 ± 0.12	0.65 ± 0.61*†
Gingival connective tissue (mm)	2.50 ± 0.84	2.02 ± 0.67	1.57 ± 0.66
Junctional epithelium (mm)	1.43 ± 0.43	0.91 ± 0.26	0.70 ± 0.38*
Cementum-like tissue volume (%)	0.0 ± 0.0	8.1 ± 5.5	39.0 ± 31.9*†

* Statistical difference compared with control group ($p < 0.05$).

† Statistical difference compared with 0.4 µg/µL BMP-2 application group ($p < 0.05$).

Tabela IV. Resultados da análise histomorfométrica 16 semanas após a cirurgia de condicionamento radicular, observando-se diferenças notórias ao nível da deposição de tecido semelhante a cimento, em mm e volume. (Fonte Miyaji *et al*⁽³⁶⁾)

Num estudo recorrendo a coelhos, Sawada *et al* testou a eficácia da BMP2 quando incorporada num hidrogel gelatinoso (rico em água - 97,8%, em volume) para a regeneração de defeitos de fissura alveolar no maxilar. Verificou-se que ocorria uma libertação controlada e favorável de BMP2, 30 dias após a implantação. Por outro lado, a utilização de BMP2 em solução originava um decréscimo elevado na acção biológica desta proteína, ao fim de 5 dias. Verificou-se assim uma regeneração óssea considerável e efectiva, com concentrações baixas de BMP2 (7,7 µg) com o recurso ao hidrogel gelatinoso como meio de *delivery*. Procura-se assim prevenir o desenvolvimento de efeitos adversos, inerentes ao uso de altas concentrações de BMPs, especialmente na zona oral, como o edema, que nesta zona poderia resultar numa obstrução grave da via aérea.⁽³⁷⁾

Num estudo de Clokie *et al*, foi investigada a eficácia de bioimplantes contendo BMP7 e alo-enxertos para elevação do seio maxilar utilizando como modelo experimental o coelho, e utilizando como controlo enxertos autólogos. Observou-se que a produção de novo tecido ósseo era mais rápida no caso do bioimplante contendo BMP7, embora a sua vantagem se perdesse com o aumento do tempo de avaliação (8 semanas - altura em que a formação óssea no grupo de

controlo com enxertos autólogos atingia o mesmo nível). Os autores concluíram que a utilização do bioimplante com BMP7 é uma alternativa ao enxerto autólogo quando este não é possível, ou quando se pretende uma formação óssea mais acelerada, numa etapa inicial do processo regenerativo.⁽³⁸⁾

A influência da rhBMP2 na formação óssea e osteointegração de implantes após elevação do seio maxilar foi estudada por Gutwald *et al*, recorrendo a ovelhas como modelo experimental e realizando elevação do seio com enxerto autólogo da pelve, de um lado, e rhBMP2 numa esponja reabsorvível de colagénio de outro lado, com colocação de implante imediatamente ou após 6 semanas. Concluiu-se que o uso de rhBMP2 leva a um aumento da densidade óssea e aumento do contacto osso/implante, embora a formação óssea não seja tão rápida como no caso controlo, em que é utilizado osso autólogo.⁽³⁹⁾ As figuras III e IV ilustram os resultados obtidos.

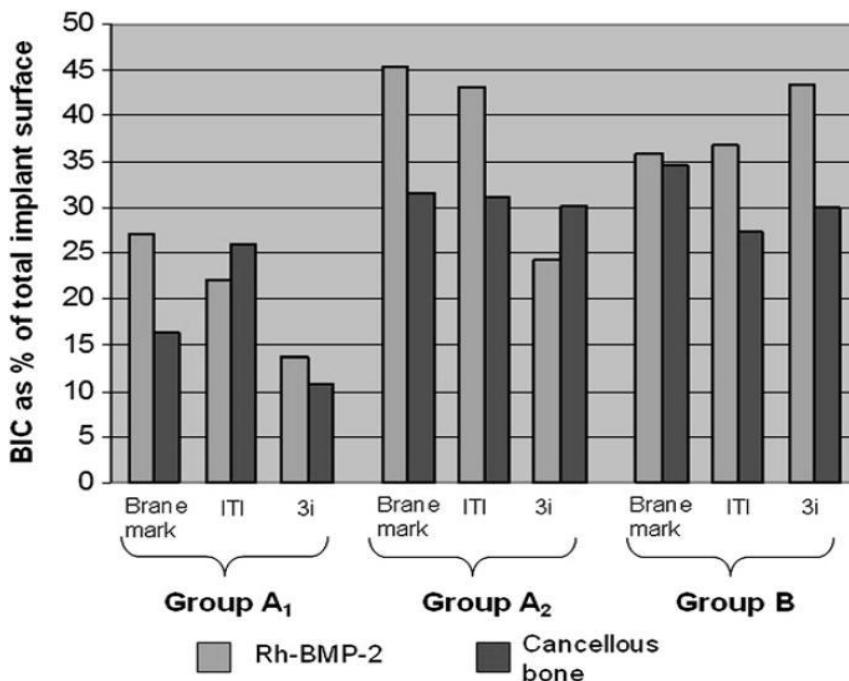


Figura III. Contacto entre osso e implante de diferentes fabricantes (Branemark®, ITI®, 3i®). Grupo A₁ – Implante imediato, resultados às 6 semanas; Grupo A₂ – Implante imediato, resultados às 12 semanas; Grupo B – Implante realizado 6 semanas após elevação do seio, resultados às 12 semanas. (Fonte: Gutwald *et al*⁽³⁹⁾)

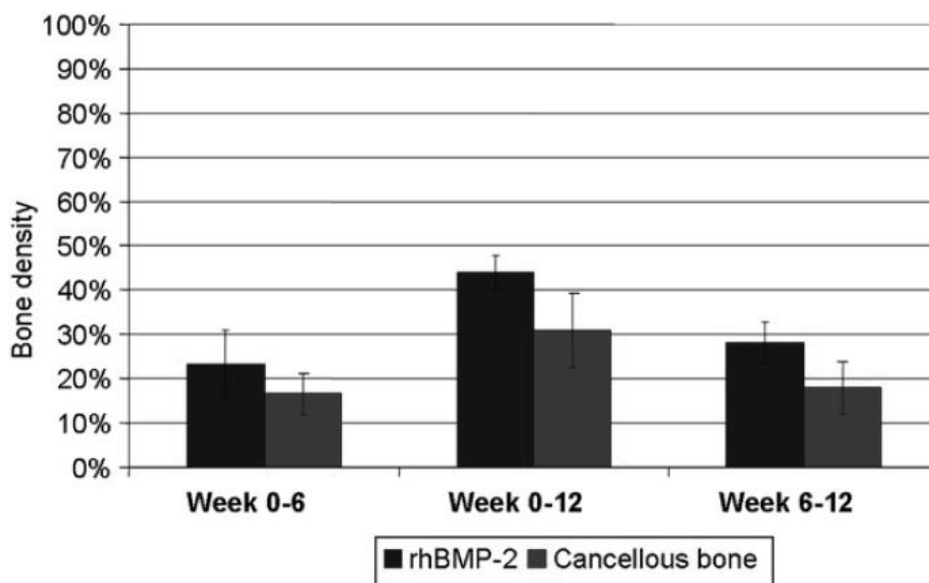


Figura IV. Densidade óssea verificada em várias alturas do estudo entre o uso de rhBMP2 e enxerto autólogo. (Fonte: Gutwald *et al*⁽³⁹⁾)

Fora do âmbito da regeneração óssea puramente aplicada a cirurgia implantar ou correcção de defeitos ósseos pode ser brevemente referido o estudo de Barnouti *et al*, que explora a expressão de BMP2/4 no caso de colocação de dispositivos de avanço mandibular, como forma de comprovar o papel fundamental das BMPs na remodelação condilar em resposta ao avanço mandibular. Verificou-se que a expressão de BMP2/4 era mais elevada que a verificada no grupo de controlo (sem avanço mandibular), obtendo diferenças estatisticamente significativas, o que levou à afirmação de que, em resposta ao avanço mandibular provocado, a BMP2/4 pode iniciar a via de sinalização para formação óssea através da aceleração e indução da diferenciação de células mesenquimatosas.⁽⁴⁰⁾

A terapia com BMPs tem aplicação em campos distintos da área de intervenção da Medicina Dentária, tal como na Endodontia, face à teoria de que as BMPs podem estimular, directamente na polpa, a diferenciação de células progenitoras em odontoblastos. Ocorreria assim a formação de dentina. Esta hipótese foi testada por Hyunjung *et al*, concluindo no seu estudo que a adição de BMP2 ao cimento de MTA reduzia a citotoxicidade inicial, não conseguindo estabelecer, no entanto, prova estatisticamente significativa de que a reacção pulpar seria melhorada com a combinação de MTA+BMP2, em comparação com o uso de MTA isoladamente.⁽⁴¹⁾

Ensaaios clínicos

Os estudos pré-clínicos têm demonstrado a eficácia da rhBMP2 na indução da formação óssea em defeitos clinicamente relevantes, sendo que esse novo osso permite osteointegração adequada e carga de implantes de titânio, observando-se ainda que implantes revestidos por rhBMP2 têm a capacidade de restabelecer a crista alveolar, resultando em formação de osso tipo II sem o uso de materiais acessórios ou técnicas de regeneração tecidual guiada, representando assim um avanço para a reabilitação oral.⁽⁴²⁾

Herford *et al* testaram a eficácia de rhBMP2 na reconstrução de defeitos de continuidade mandibular (defeitos entre os 4 cm e os 8 cm) em pacientes sujeitos a cirurgia de ressecção parcial da mandíbula, sem o uso concomitante de enxertos ósseos autólogos convencionais ou outro tipo de material osteocondutor. Foi aplicada rhBMP2, implantada localmente numa membrana de colagénio biodegradável em conjunto com uma placa/infra-estrutura de titânio de forma a evitar a compressão do defeito ósseo. Verificou-se que, 3 a 4 meses após a cirurgia, todos os pacientes apresentavam evidência radiográfica de formação óssea induzida por uma resposta controlada a altas concentrações de rhBMP2, tendo 2 deles sido sujeitos a colocação de implantes para reabilitação protética ao fim de 6 meses pós-cirurgia.⁽⁴³⁾ Relatam ainda o efeito benéfico sobre os tecidos moles, referindo a rhBMP2 como uma alternativa viável para o tratamento de zonas necróticas ou pouco vascularizadas, como as encontradas em osteorradionecrose ou osteonecrose por bifosfonatos.⁽⁴³⁾

Cloakie *et al* relatam a reconstrução de grandes defeitos mandibulares recorrendo a bioimplantes contendo BMP7 num estudo com 10 pacientes, cujos defeitos eram decorrentes de ressecção devido a ameloblastoma ou osteomielite. Os autores relataram sucesso na formação óssea mandibular em todos os casos, e reconstrução funcional e estética ao fim de 1 ano, tendo sido a BMP7 incorporada no bioimplante com a ajuda de uma suspensão de matriz óssea desmineralizada. Observou-se a formação de tecido ósseo com um comportamento biológico e biomecânico normal, resultando ultimamente em reabsorção do bioimplante contendo BMP7, sendo este substituído por tecido ósseo neo-formado.⁽⁴⁴⁾

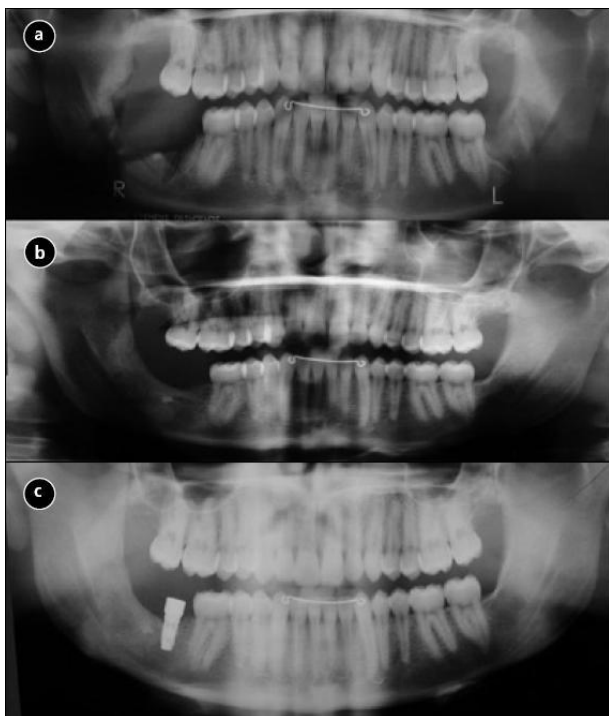


Figura V. Radiografia panorâmica de paciente incluído no estudo de Clokie *et al*, demonstrando defeito ósseo mandibular considerável decorrente de ressecção cirúrgica no sector posterior direito. (a) – Imagem inicial; (b) – 1 ano após reconstrução com bioimplante contendo BMP7; (c) – 4 meses após colocação de implante, verificando-se osteointegração do mesmo no osso recém regenerado. (Fonte: Clokie et al⁽⁴⁴⁾)

Tom *et al* debruçaram-se também sobre a reconstrução de um segmento mandibular usando neste caso a rhBMP2. Observou-se estabilidade mecânica e normal histologia do tecido ósseo formado, no relato de um caso de uma criança do sexo feminino que nasceu com uma fissura facial e hipoplasia mandibular esquerda, tendo sido realizada regeneração mandibular com rhBMP2, seguida de osteotomia e subsequente distração óssea, observando-se consolidação e crescimento do novo tecido ósseo.⁽⁴⁵⁾

Relativamente ainda a reconstrução de fissuras faciais com defeito mandibular extenso, pode ser referido o relato de caso de Carstens *et al*, onde a abordagem terapêutica fez uso de rhBMP2, em combinação com implante de colagénio *Heliostat*®, observando-se sucesso clínico na reconstrução mandibular.⁽⁴⁶⁾

No Síndrome de Pierre Robin, a microrretrognatia resulta em problemas respiratórios, pelo que o tratamento pode passar pela distração mandibular, caso esse abordado por Franco *et al*, onde se verificaram resultados satisfatórios no uso de rhBMP2 num protocolo de combinação com outros biomateriais, como placas reabsorvíveis. Verificou-se um alívio dos problemas respiratórios e observou-se apenas um caso de não-união.⁽⁴⁷⁾

Também Herford *et al* relatam sucesso na reconstrução mandibular com o uso de rhBMP2, num caso de ressecção cirúrgica do corpo mandibular por tumor de células gigantes, concluindo que o uso de rhBMP2 sem uso concomitante de materiais de enxerto ósseo adicionais resultava em excelente regeneração da área do defeito mandibular.⁽⁴⁸⁾

Tarnow et al relatam 3 casos clínicos de elevação do seio maxilar utilizando rhBMP2 em esponja de colagénio acelular- ACS (*Acellular Collagen Sponge*), em combinação com enxerto de osso desmineralizado, observando que a contracção da esponja era menor quando a rhBMP2 era utilizada. Verificou-se também que a formação óssea era semelhante quando utilizados dois volumes diferentes de rhBMP2 em combinação com a esponja de ACS, concluindo, no entanto, que se verifica necessidade de mais ensaios clínicos controlados e randomizados, pois o presente estudo apresenta como falha o número de amostras (3 pacientes), não sendo possível efectuar uma extrapolação credível dos resultados observados.⁽⁴⁹⁾

Numa avaliação da eficácia de rhBMP2 e ACS *versus* enxertos ósseos autólogos na elevação do seio maxilar, Triplett *et al* observaram maior densidade óssea no grupo de rhBMP2/ACS comparativamente ao grupo de enxertos ósseos autólogos, não se verificando diferenças na análise histológica, concluindo assim acerca da segurança e eficácia de rhBMP2/ACS comparativamente ao enxerto ósseo autólogo.⁽⁵⁰⁾

Schuckert *et al* descrevem um caso de uma paciente de 75 anos de idade, em que foi realizado aumento vertical da maxila, devido a grave atrofia maxilar e prévia rejeição de enxerto ósseo proveniente da crista ilíaca. O protocolo terapêutico incluiu a implantação de blocos de fosfato tricálcico embebidos em rhBMP2 e PRP (Platelet-Rich Plasma – *Plasma Rico em Plaquetas*), observando regeneração óssea considerável, permitindo assim a colocação de seis implantes no osso recém-formado.⁽⁵¹⁾

Também Glied et al procuraram aferir a eficácia da rhBMP2 na reconstrução de defeitos ósseos mandibulares, num relato de 3 casos clínicos. Estes casos sofreram ressecção cirúrgica, dois devido a ameloblastoma e o terceiro devido a osteomielite. A rhBMP2 foi transportada numa membrana de colagénio reabsorvível, na ausência de um biomaterial de preenchimento. Verificou-se uma formação óssea insuficiente devido provavelmente ao facto de a rhBMP2 ter-se difundido rapidamente do local de acção desejada. Os autores concluíram que em defeitos de maior dimensão, pode ser necessário o uso de uma estrutura osteocondutora estável em conjugação com um factor osteoindutivo.⁽⁵²⁾

Junge *et al*, num ensaio clínico randomizado, avaliaram o resultado clínico e radiológico da colocação de implantes em zonas regeneradas através de técnicas de regeneração tecidual guiada, com e sem adição de BMP2. Após 3 e 5 anos, verificou-se que a taxa de sobrevivência dos implantes era de 100% para os locais de teste assim como para os locais de controlo, não se observando em radiografias periapicais radiolucência peri-implantar, concluindo que os implantes colocados apresentavam excelente resultado clínico e radiológico, tanto para o grupo

utilizando BMP2 como para o grupo de controlo. Os autores ressaltaram, no entanto, que o estudo carece de maior número de pacientes para ter maior expressividade nos resultados.⁽⁵³⁾

Discussão

Embora a descoberta das BMPs tenha ocorrido há já bastante tempo, e inúmeros trabalhos se tenham debruçado sobre este tema, restam ainda dúvidas relativamente à utilização de abordagens clínicas com BMPs, nomeadamente relativamente à segurança, previsibilidade e aplicabilidade destas moléculas em intervenções do foro da Medicina Dentária.

As vias moleculares de sinalização das BMPs têm sido intensamente investigadas, com descobertas importantes a nível dos mecanismos regulatórios (inibitórios e indutores) da sua acção, que até há pouco tempo eram desconhecidos. Desta forma foram abertas portas para aplicações mais direccionadas a certos pontos específicos da sinalização BMP, e a sua conjugação em fenómenos de regeneração óssea *versus* uma abordagem mais generalizada e indiscriminada do uso das BMPs.

Os estudos *in vitro* elaborados até agora permitem um vislumbre sobre a abrangência que as BMPs podem ter em processos regenerativos, tanto na reconstrução de defeitos ósseos, como em Implantologia, por exemplo, denotando-se aqui que o campo de acção das BMPs, embora seja essencialmente e puramente presente na regeneração óssea, directa ou indirectamente fornece bases para a multidisciplinaridade exigida pela reabilitação oral.

O recurso a técnicas inovadoras como a introdução de sequências genéticas para a produção de uma BMP específica em vectores como adenovírus é uma hipótese que se reveste de grande interesse, sendo que a sua utilização pode permitir que o próprio organismo seja utilizado pelo adenovírus para dessa forma expressar BMPs autólogas, resultando num aumento da sua concentração sem que para isso se tenha que recorrer à introdução no local de BMPs exógenas. No entanto é uma hipótese que ainda necessita de bastante pesquisa, essencialmente na sua aplicação em modelos experimentais vivos e posteriormente em ensaios clínicos, validando dessa forma a sua utilização clínica.

Dos estudos analisados no presente trabalho verifica-se que existe unanimidade no reconhecimento do potencial das BMPs para a regeneração óssea, relevando-se determinadas BMPs específicas como as que possuem maior potencial, casos da BMP2 e da BMP7, principalmente como a que é constatada através dos estudos que delas fazem uso na reconstrução de grandes defeitos ósseos mandibulares, com relato de grande sucesso, embora se possa apontar a falta de ensaios clínicos randomizados, com um maior número de pacientes, quer no grupo experimental, quer no grupo controlo.

Da análise dos ensaios clínicos referenciados, é possível verificar que os resultados não são unanimemente relatados como superiores a outro tipo de materiais ou claramente efectivos na regeneração de um defeito, podendo rebater-se estes resultados com falhas de metodologia de algumas abordagens, seja no baixo número de pacientes participantes nos ensaios clínicos, seja por defeitos de cariz mais clínico, como a ausência de um material de preenchimento ou uma infra-estrutura que impeça a difusão da BMP e consequentemente perda da sua acção quando se fala de defeitos ósseos de grandes dimensões. No entanto, apesar de resultados díspares, torna-se unânime a opinião de que mais estudos são necessários, assim como estudos com metodologias cada vez mais refinadas, de forma a poderem ser colhidos resultados que se revelem verdadeiramente significativos.

Conclusão

Do presente trabalho é possível concluir que o uso das BMPs se revela bastante benéfico e a sua eficácia se revela mesmo superior a outro tipo de abordagens de regeneração óssea tidos como “*gold standard*”, podendo ser utilizados em Implantologia de forma a melhorar a osteointegração do implante, assim como para reconstrução de grandes defeitos ósseos. A compreensão dos seus mecanismos de acção tem sido, ao longo dos anos, cada vez mais detalhado. No entanto verifica-se que o aprofundamento do conhecimento das vias biológicas reveste-se de uma complexidade crescente em termos de mecanismos de regulação, e dificulta o estabelecimento de estratégias terapêuticas simplificadas e orientadas para a regeneração óssea. No entanto, grandes progressos têm sido conseguidos e resultados clínicos de sucesso têm sido atingidos com o seu uso.

Ainda hoje em dia é discutível se o real benefício que as BMPs podem trazer para a regeneração óssea, principalmente na área da Medicina Dentária, é realmente compensável pelos custos sócio-económicos que acarretam, sendo normalmente utilizados outros meios de regeneração óssea, como enxertos autólogos por exemplo, num contexto mais rotineiro. Desta forma, é necessário que os ensaios clínicos abordando BMPs sejam intensificados, a sua metodologia melhorada e que sejam incluídos cada vez mais pacientes nesse tipo de estudos, para que se possa chegar a resultados credíveis, passíveis de serem extrapolados para uma realidade mais clínica, viabilizando o seu uso na Medicina Dentária como um método de eleição para a regeneração óssea.

Bibliografia

1. Vasconcelos MR. Cerâmicos bioactivos na reconstrução do tecido ósseo. Porto: University of Oporto; 2001.
2. Cabral MC. Estudo do Tecido Ósseo Relacionado com Patologias dos Maxilares e Influência de Materiais Exógenos. Porto: University of Oporto; 2004.
3. Mesquita PMV. Avaliação do Comportamento de Células Osteoblásticas na Presença de Diferentes Superfícies de Implantes [Doctorate Degree]. Porto: University of Oporto; 2009.
4. Gomes PS. In Vitro Osteogenic Performance of Bonelike ® Modulated by Tetracyclines. Porto: University of Oporto; 2008.
5. Peterson LJ. Wound Healing. In: Miloro M, editor. Peterson's Principles of Oral and Maxillofacial Surgery. 2nd ed. London: BC Decker Inc; 2004. p. 3 - 16.
6. Aldecoa EA. Repair vs Regeneration. A New Approach to Bone Regeneration - Plasma Rich in Growth Factors (PRGF). Vitoria - Spain: Puesta Al Dia Publicaciones, S.L.; 2001. p. 35 - 46.
7. Aldecoa EA. Basic Principles For Bone Regeneration. A New Approach To Bone Regeneration - Plasma Rich in Growth Factors (PRGF). Vitoria - Spain: Puesta Al Dia Publicaciones, S.L.; 2001. p. 49 - 76.
8. Buser D, Dahlin C, Schenk RK. Bone Regeneration: Biologic Basis. In: Bateman LA, editor. Guided Bone Regeneration in Implant Dentistry: Quintessence Publishing Co, Inc; 1994. p. 49 - 100.
9. Rosen V. BMP and BMP inhibitors in bone. *Ann N Y Acad Sci.* 2006 Apr;1068:19-25.
10. Abe E. Function of BMPs and BMP antagonists in adult bone. *Ann N Y Acad Sci.* 2006 Apr;1068:41-53.
11. Bessa PC, Casal M, Reis RL. Bone morphogenetic proteins in tissue engineering: the road from the laboratory to the clinic, part I (basic concepts). *J Tissue Eng Regen Med.* 2008 Jan;2(1):1-13.
12. Groeneveld EH, Burger EH. Bone morphogenetic proteins in human bone regeneration. *Eur J Endocrinol.* 2000 Jan;142(1):9-21.
13. Singhatanadgit W, Salih V, Olsen I. Bone morphogenetic protein receptors and bone morphogenetic protein signaling are controlled by tumor necrosis factor-alpha in human bone cells. *Int J Biochem Cell Biol.* 2006;38(10):1794-807.

14. Sieber C, Kopf J, Hiepen C, Knaus P. Recent advances in BMP receptor signaling. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2009 Oct-Dec;20(5-6):343-55.
15. Barros LFM, Machado TFS, Ferraz VM, Ferrigno CRA. Proteínas Morfogenéticas Ósseas (BMP's): Modo de acção, Aplicação e Carreadores. *Ciênc Vet Tróp, Recife-PE.* [Review Article]. 2006 Jan 2006;9(1):1 - 8.
16. ten Dijke P, Korchynskiy O, Valdimarsdottir G, Goumans MJ. Controlling cell fate by bone morphogenetic protein receptors. *Mol Cell Endocrinol.* 2003 Dec 15;211(1-2):105-13.
17. Bragdon B, Moseychuk O, Saldanha S, King D, Julian J, Nohe A. Bone morphogenetic proteins: a critical review. *Cell Signal.* 2011 Apr;23(4):609-20.
18. Liu H, Zhang R, Chen D, Oyajobi BO, Zhao M. Functional redundancy of type II BMP receptor and type IIB activin receptor in BMP2-induced osteoblast differentiation. *J Cell Physiol.* 2011 Apr 18.
19. David L, Feige JJ, Bailly S. Emerging role of bone morphogenetic proteins in angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2009 Jun;20(3):203-12.
20. Canalis E. Growth factor control of bone mass. *J Cell Biochem.* 2009 Nov 1;108(4):769-77.
21. Rider CC, Mulloy B. Bone morphogenetic protein and growth differentiation factor cytokine families and their protein antagonists. *Biochem J.* 2010 Jul 1;429(1):1-12.
22. Zeng S, Chen J, Shen H. Controlling of bone morphogenetic protein signaling. *Cell Signal.* 2010 Jun;22(6):888-93.
23. Miyazono K, Kamiya Y, Morikawa M. Bone morphogenetic protein receptors and signal transduction. *J Biochem.* 2010 Jan;147(1):35-51.
24. Song B, Estrada KD, Lyons KM. Smad signaling in skeletal development and regeneration. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2009 Oct-Dec;20(5-6):379-88.
25. Jensen ED, Gopalakrishnan R, Westendorf JJ. Regulation of gene expression in osteoblasts. *Biofactors.* 2010 Jan-Feb;36(1):25-32.
26. Franceschi RT, Wang D, Krebsbach PH, Rutherford RB. Gene therapy for bone formation: in vitro and in vivo osteogenic activity of an adenovirus expressing BMP7. *J Cell Biochem.* 2000 Jun 6;78(3):476-86.
27. Bell RB, Gregoire C. Reconstruction of mandibular continuity defects using recombinant human bone morphogenetic protein 2: a note of caution in an atmosphere of exuberance. *J Oral Maxillofac Surg.* 2009 Dec;67(12):2673-8.

28. Haidar ZS, Hamdy RC, Tabrizian M. Delivery of recombinant bone morphogenetic proteins for bone regeneration and repair. Part A: Current challenges in BMP delivery. *Biotechnol Lett.* 2009 Dec;31(12):1817-24.
29. Bessa PC, Casal M, Reis RL. Bone morphogenetic proteins in tissue engineering: the road from laboratory to clinic, part II (BMP delivery). *J Tissue Eng Regen Med.* 2008 Mar-Apr;2(2-3):81-96.
30. Bergeron E, Marquis ME, Chretien I, Faucheux N. Differentiation of preosteoblasts using a delivery system with BMPs and bioactive glass microspheres. *J Mater Sci Mater Med.* 2007 Feb;18(2):255-63.
31. Kawai M, Maruyama H, Bessho K, Yamamoto H, Miyazaki J, Yamamoto T. Simple strategy for bone regeneration with a BMP-2/7 gene expression cassette vector. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009 Dec 18;390(3):1012-7.
32. Ivanovski S, Hamlet S, Salvi GE, Huynh-Ba G, Bosshardt DD, Lang NP, et al. Transcriptional profiling of osseointegration in humans. *Clin Oral Implants Res.* 2011 Apr;22(4):373-81.
33. Vlacic-Zischke J, Hamlet SM, Friis T, Tonetti MS, Ivanovski S. The influence of surface microroughness and hydrophilicity of titanium on the up-regulation of TGFbeta/BMP signalling in osteoblasts. *Biomaterials.* 2011 Jan;32(3):665-71.
34. Tada H, Nemoto E, Kanaya S, Hamaji N, Sato H, Shimauchi H. Elevated extracellular calcium increases expression of bone morphogenetic protein-2 gene via a calcium channel and ERK pathway in human dental pulp cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010 Apr 16;394(4):1093-7.
35. Shin JH, Kim KH, Kim SH, Koo KT, Kim TI, Seol YJ, et al. Ex vivo bone morphogenetic protein-2 gene delivery using gingival fibroblasts promotes bone regeneration in rats. *J Clin Periodontol.* 2010 Mar;37(3):305-11.
36. Miyaji H, Sugaya T, Ibe K, Ishizuka R, Tokunaga K, Kawanami M. Root surface conditioning with bone morphogenetic protein-2 facilitates cementum-like tissue deposition in beagle dogs. *J Periodontal Res.* 2010 Oct;45(5):658-63.
37. Sawada Y, Hokugo A, Nishiura A, Hokugo R, Matsumoto N, Morita S, et al. A trial of alveolar cleft bone regeneration by controlled release of bone morphogenetic protein: an experimental study in rabbits. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2009 Dec;108(6):812-20.

38. Ho SK, Peel SA, Hu ZM, Sandor GK, Clokie CM. Augmentation of the maxillary sinus: comparison of bioimplants containing bone morphogenetic protein and autogenous bone in a rabbit model. *J Can Dent Assoc.* 2010;76:a108.
39. Gutwald R, Haberstroh J, Stricker A, Ruther E, Otto F, Xavier SP, et al. Influence of rhBMP-2 on bone formation and osseointegration in different implant systems after sinus-floor elevation. An in vivo study on sheep. *J Craniomaxillofac Surg.* 2010 Dec;38(8):571-9.
40. Barnouti ZP, Owtad P, Shen G, Petocz P, Darendeliler MA. The biological mechanisms of PCNA and BMP in TMJ adaptive remodeling. *Angle Orthod.* 2011 Jan;81(1):91-9.
41. Ko H, Yang W, Park K, Kim M. Cytotoxicity of mineral trioxide aggregate (MTA) and bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) and response of rat pulp to MTA and BMP-2. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2010 Jun;109(6):e103-8.
42. Wikesjo UM, Qahash M, Huang YH, Xiropaidis A, Polimeni G, Susin C. Bone morphogenetic proteins for periodontal and alveolar indications; biological observations - clinical implications. *Orthod Craniofac Res.* 2009 Aug;12(3):263-70.
43. Herford AS, Boyne PJ. Reconstruction of mandibular continuity defects with bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2). *J Oral Maxillofac Surg.* 2008 Apr;66(4):616-24.
44. Clokie CM, Sandor GK. Reconstruction of 10 major mandibular defects using bioimplants containing BMP-7. *J Can Dent Assoc.* 2008 Feb;74(1):67-72.
45. William K. Tom MC, Theodore Ng, Slim Bouchoucha, Michael Carstens. Distraction of rhBMP-2-Generated Mandible: How Stable Is the Engineered Bone in Response to Subsequent Surgeries? *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery.* 2008;66:1499-505.
46. Carstens MH, Chin M, Ng T, Tom WK. Reconstruction of #7 facial cleft with distraction-assisted in situ osteogenesis (DISO): role of recombinant human bone morphogenetic protein-2 with Helistat-activated collagen implant. *J Craniofac Surg.* 2005 Nov;16(6):1023-32.
47. Franco J, Coppage J, Carstens MH. Mandibular distraction using bone morphogenic protein and rapid distraction in neonates with Pierre Robin syndrome. *J Craniofac Surg.* 2010 Jul;21(4):1158-61.
48. Herford AS, Cicciu M. Recombinant human bone morphogenetic protein type 2 jaw reconstruction in patients affected by giant cell tumor. *J Craniofac Surg.* 2010 Nov;21(6):1970-5.
49. Tarnow DP, Wallace SS, Testori T, Froum SJ, Motroni A, Prasad HS. Maxillary sinus augmentation using recombinant bone morphogenetic protein-2/acellular collagen sponge

in combination with a mineralized bone replacement graft: a report of three cases. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2010 Apr;30(2):139-49.

50. Triplett RG, Nevins M, Marx RE, Spagnoli DB, Oates TW, Moy PK, et al. Pivotal, randomized, parallel evaluation of recombinant human bone morphogenetic protein-2/absorbable collagen sponge and autogenous bone graft for maxillary sinus floor augmentation. *J Oral Maxillofac Surg.* 2009 Sep;67(9):1947-60.
51. Schuckert KH, Jopp S, Osadnik M. Modern bone regeneration instead of bone transplantation: a combination of recombinant human bone morphogenetic protein-2 and platelet-rich plasma for the vertical augmentation of the maxillary bone-a single case report. *Tissue Eng Part C Methods.* 2010 Dec;16(6):1335-46.
52. Glied AN, Kraut RA. Off-label use of rhBMP-2 for reconstruction of critical-sized mandibular defects. *N Y State Dent J.* 2010 Jun-Jul;76(4):32-5.
53. Jung RE, Windisch SI, Eggenschwiler AM, Thoma DS, Weber FE, Hammerle CH. A randomized-controlled clinical trial evaluating clinical and radiological outcomes after 3 and 5 years of dental implants placed in bone regenerated by means of GBR techniques with or without the addition of BMP-2. *Clin Oral Implants Res.* 2009 Jul;20(7):660-6.