

Sara Catarina da Silva Carvalho

# O Papel das BMPs na Regeneração Óssea

Universidade Fernando Pessoa  
Faculdade de Ciências da Saúde

Porto, 2015



Sara Catarina da Silva Carvalho

## O Papel das BMPs na Regeneração Óssea

Universidade Fernando Pessoa  
Faculdade de Ciências da Saúde

Porto, 2015

Sara Catarina da Silva Carvalho

## O Papel das BMPs na Regeneração Óssea

Trabalho apresentado à Universidade Fernando Pessoa,  
Como parte dos requisitos para a obtenção  
Do grau de Mestre em Medicina Dentária

---

## Resumo

O tecido ósseo quando lesado possui capacidade de regeneração. No entanto, na presença de certas patologias ou lesões, esta capacidade poderá ser comprometida. Neste contexto, a fração de uma proteína foi isolada da matriz óssea desmineralizada, denominando-se *Bone Morphogenetic Proteins* (BMPs) ou Proteínas Morfogenéticas do Osso; descobertas pelo Dr. Marshall Urist em 1965. Estas proteínas parecem constituir uma boa alternativa no contorno deste problema, uma vez que possuem capacidade de formar cartilagem e novo osso (inclusive osso heterotópico). O seu uso clínico foi aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA), respetivamente a BMP 7 e BMP 2. Devido ao seu potencial osteoindutivo e osteocondutivo, vários estudos *in vitro* e *in vivo* têm decorrido desde a sua descoberta. Sendo que estes fatores tornaram-se de grande interesse em várias áreas como a Ortopedia na Medicina e Cirurgia Oral na Medicina Dentária.

Esta revisão bibliográfica tem como intuito o esclarecimento a partir da informação disponível acerca destas proteínas, nomeadamente, a sua constituição, mecanismos de ação, fatores condicionantes e potenciadores da sua ação, aplicações clínicas (inclusive na área da Medicina Dentária) e limitações no seu uso como fator regenerativo.

Palavras-chave: “*bone tissue*”, “*bone regeneration*”, “*bone morphogenetic protein*”, “*BMP*”, “*BMP functions*”, “*BMP signalling*”, “*BMP–Smad signaling*”, “*SMAD independent*”, “*MAPKs*”, “*BMP antagonists*”, “*BMP 2*”, “*BMP 7*”, “*BMP applications*”.

## **Abstract**

Bone tissue when injured has the ability of regeneration. However, in the presence of certain pathologies or lesions, this ability can be compromised. In this context, a fraction of a protein was isolated from the demineralized bone matrix, called *Bone Morphogenetic Proteins* (BMPs); discovered by Dr. Marshall Urist in 1965. These proteins appear to be a good alternative to overcome this problem, as they possess the ability to form new cartilage and bone, even heterotopic bone. Their clinical use was approved by *Food and Drug Administration* (FDA), respectively BMP 7 and BMP 2. Due to their osteoinductive and osteoconductive potential, several *in vitro* and *in vivo* studies have occurred since their discovery. Therefore these factors have become of great interest in various fields such as Orthopedics in Medicine and Oral Surgery in Dentistry.

This literature review has the aim to clarify the available information about these proteins, namely, their constitution, mechanisms of action, conditioning factors and enhancers of their action, clinical applications (including in the field of Dentistry) and limitations of their use as a regenerative factor.

Key-words: “*bone tissue*”, “*bone regeneration*”, “*bone morphogenetic protein*”, “*BMP*”, “*BMP functions*”, “*BMP signalling*”, “*BMP–Smad signaling*”, “*SMAD independent*”, “*MAPKs*”, “*BMP antagonists*”, “*BMP 2*”, “*BMP 7*”, “*BMP applications*”.

## **Dedicatória**

Todo o meu percurso académico é dedicado aos meus Pais e irmãos, uma vez que sem eles nunca teria chegado até aqui. Um obrigado pelo amor, amizade, valores e apoio com que sempre me presenciaram.

Às minhas melhores amigas Paula Catarina, Alexandra Sousa e Nádía Marques. Um grande obrigado a vocês por tudo, pelas risadas, pelo suporte, pela confiança e por estarem sempre do meu lado. Neste contexto, principalmente a ti Nádía, que melhor que ninguém vivenciaste e partilhaste todos os nossos “apertos” de faculdade, obrigada Binómia.

Ao meu namorado, Pedro Nogueira, pelo amor e compreensão.

E por fim e não menos importante, às minhas grandes amizades coletadas ao longo destes cinco anos, que sem dúvida contribuíram para aquilo que sou hoje: Eduardo Flor, Miguel Ferreira, José Miguel, João Teles, Vasco Sala.

Muito obrigada por tudo e por fazerem parte da minha vida!

## **Agradecimentos**

Agradeço ao meu coordenador Dr. Paulo Macedo, pela atenção, rigor e amabilidade com que sempre me atendeu na construção deste trabalho.

Muito obrigada por todos os ensinamentos transmitidos.

## Índice Geral

Índice de Figuras .....	ii
Índice de Abreviaturas e Siglas .....	iii
<b>I. Introdução</b> .....	1
<b>II. Desenvolvimento</b> .....	3
<b>1. Materias e Métodos</b> .....	3
<b>2. Tecido Ósseo</b> .....	3
2.1. Remodelação/Reparação/Regeneração Óssea.....	6
<b>3. BMPs</b> .....	9
3.1. Estrutura .....	10
3.2. Características e Funções .....	11
3.3. BMPS Heterodiméricas.....	14
<b>4. Vias de Sinalização e Regulação</b> .....	14
4.1. Recetores tipo II .....	16
4.2. Recetores tipo I.....	16
4.3. Via Smad–dependent.....	17
4.4. Vias Smad–Independent.....	19
4.5. <i>Crosstalk</i> com outras Vias de Sinalização .....	20
4.6. Antagonistas .....	22
4.7. Co-Receptores / Proteínas Regulatórias Intracelulares .....	24
<b>5. Aplicações</b> .....	28
5.1. Aplicações em Medicina Dentária .....	32
5.2. Futuras Aplicações .....	35
<b>6. Estudos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i></b> .....	35
<b>7. Limitações</b> .....	41
<b>III. Conclusão</b> .....	44
<b>IV. Bibliografia</b> .....	46

## Índice de Figuras

**Figura 1:** Ilustração do Ciclo de Remodelação óssea (Gurnell, M., Ralston, S.H., Chattrjee, K. 2013).....7

**Figura 2:** Elucidação de algumas vias de Sinalização das BMPs (Smad–dependent e Smad–independent) e a sua respetiva regulação. É de notar o crosstalk existente entres as diferentes vias, assim como, a presença de antagonistas (Noggin e Chordin), citocinas e fatores reguladores e ainda fatores de transcrição resultantes da respetiva transdução do sinal (Carreira, A.C. et al., 2014).....27

## Índice de Abreviaturas e Siglas

µg - Micrograma

µm - Micrómetro

ACS - Absorbable collagen sponge

ALK - Alkaline phosphatase

BAMBI - BMP and Activin Membrane-Bound Inhibitor

BFP-1 - Bone forming peptide-1

BMPs - Bone Morphogenetic Proteins

C2C12 - Mouse myoblast cell line

Chd - Chordin

CHO - Chinese hamster ovary

co-Smad - Common mediator Smad

Dlx5 - Distal-less homeobox 5

DPCs - Dental pulp cells

EGF - Epidermal growth factor

## O papel das BMPs na Regeneração Óssea

ERK - Extracelular signal-regulated kinase

FDA - Food and Drug Administration

FGF - Fibroblast growth factor

GS - Glycine-Serine

Id genes - Inhibitor of differentiation genes

IGF - Insulin-like growth factor

I-Smads - Inhibitory Smads

IL-1 $\beta$  - Interleukin-1 beta

IL-6 - Interleukin 6

IL-8 - Interleukin 8

JNK - Jun n-terminal kinase

lg - Litrograma

LIF - Leukemia inhibitory factor

MAPK - Mitogen-activated protein kinase

MBSCs - Multipotent bone marrow stromal stem cells

mESCs - Mouse embryonic stem cells

mg - Miligrama

mg/mL - Miligrama/Mililitro

ml - Mililitro

MSCs - Mesenchymal stem cells

Msx2 - Msh homeobox 2

NF $\kappa$ B - Nuclear factor kappa B

ng - Nanograma

OC - Osteocalcin

OGN - Osteoglycin

Osx - Osterix

p38 - p38 MAPK

PCL - Polycaprolactone

PDGF - Platelet-derived growth factor

PDGF-b - Platelet-derived growth factor-B

PEG - Polyethylene glycol

PI3K - Phosphatidylinositol 3-kinase

PLGA - Poly lactic-co-glycolic acid

PPAR- $\gamma$  - Peroxisome proliferator-activated receptor gamma

PPM1A - Protein phosphatase magnesium-dependent 1A

R-Smads - Receptor-regulated Smads

RCT - Randomized controlled trial

rhBMP - Recombinant human protein

Runx2 - Runt-related transcription factor 2

SCPs - Small C-terminall domain phosphatases

SHH - Sonic Hedghog

Smurf1 - Smad ubiquitin regulatory factor 1

SVS - Serine-valine-serine

TAK1 - TGF $\beta$ 1-activated tyrosine kinase 1

TGF - Transforming growth factor

## O papel das BMPs na Regeneração Óssea

TGF- $\beta$  - Transforming growth factor beta

TGF $\beta$ -1 - Transforming growth factor beta 1

TNF- $\alpha$  - Tumor necrosis factor alpha

XIAP - X-linked inhibitor of apoptosis protein

## **I. Introdução**

O tema escolhido para dissertação de mestrado consiste numa Revisão Bibliográfica sobre: “O Papel das BMPs na Regeneração Óssea”.

O motivo principal da escolha deste tema, residuiu no interesse da autora sobre a Reabilitação Oral, que é um campo importantíssimo na Medicina Dentária. Dada a importância de se adquirir uma atitude clínica o mais conservadora possível, e a elevada exigência e expectativa por parte dos doentes, é essencial adotar técnicas eficazes e o menos invasivas possível nos tratamentos dentários. Desta forma, foi excluída a abordagem do uso de enxertos de osso autólogo (que é considerado o “*gold standard*”), assim como, os aloenxertos e xenoenxertos.

O uso de biomateriais com o fim de obter Regeneração Óssea é uma prática crescente. Neste sentido, a escolha da exploração deste tema residuiu no facto de ser atual e ainda em desenvolvimento, com diversa informação disponível, mas contudo, ainda com lacunas a serem melhor estudadas e exploradas; pelo importante impacto e relevância científica que as Proteínas Morfogénicas Ósseas exercem em várias áreas da saúde, inclusive, em Medicina Dentária. E ainda, devido ao desenvolvimento constante da Engenharia Tecidual, o que num futuro próximo, poderá proporcionar a utilização rotineira destas proteínas na prática clínica devido às suas excelentes propriedades, que serão abordadas no decorrer deste trabalho.

As Proteínas Morfogénicas Ósseas, denominadas por BMPs, são provavelmente os fatores de crescimento mais estudados e mais eficientes na cura de lesões ósseas e formação óssea.

São membros da superfamília do *Transforming growth factor beta* (TGF- $\beta$ ), representam um papel reconhecido no desenvolvimento de vertebrados e invertebrados, atuam em várias células, nomeadamente na diferenciação de células mesenquimais em osteoblastos, contribuindo assim para a formação óssea. Exercem inúmeras funções fulcrais, como o correto desenvolvimento embrionário assim como, reparação óssea em fraturas. A sua potente característica osteoindutiva e osteocondutiva é reconhecida desde 1965, através de um Cirurgião Ortopedista Marshall Urist, que verificou que a matriz descalcificada óssea contém uma propriedade morfogenética que possibilita a formação óssea em diferentes tecidos, atuando como um fator de crescimento. Desde então, estas citocinas foram isoladas e identificadas. Inúmeras investigações e tentativas de formulação de estratégias mais eficazes do uso de BMPs na reparação óssea têm decorrido.

As BMPs 2 e -7, são as mais estudadas, devido aos excelentes resultados apresentados no processo de regeneração óssea. São as únicas BMPs disponibilizadas para tratamento de várias condições patológicas, contudo, a sua utilização clínica ainda é um pouco restrita e recente devido à dificuldade de conjugar a produção destas proteínas em larga escala com a conservação do seu potencial a um baixo custo, assim como, o desconhecimento de todos os fatores e células envolvidas no seu complexo mecanismo de funcionamento.

A regeneração tecidual é um processo de elevada complexidade, contudo espera-se que a Engenharia Tecidual, um campo em crescente desenvolvimento, ultrapasse as limitações existentes associadas a estas proteínas e crie um impulso do uso destas em diversas áreas, como a Medicina Dentária.

## II. Desenvolvimento

### 1. Materias e Métodos

A construção desta monografia baseou-se numa pesquisa bibliográfica procedida em repositórios científicos e livros relacionados com a histologia do tecido ósseo, pertencentes às Bibliotecas da Universidade Fernando Pessoa e Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto.

Os motores de busca de base de dados utilizados nesta pesquisa foram: *PubMed*, *BioMed*, *Science Direct* e *B-on*. Os artigos compreendidos nesta revisão contemplam os últimos 15 anos e as palavras-chave utilizadas na pesquisa destes foram: “*bone tissue*”, “*bone regeneration*”, “*bone morphogenetic protein*”, “*BMP*”, “*BMP functions*”, “*BMP signalling*”, “*BMP–Smad signaling*”, “*SMAD independent*”, “*MAPKs*”, “*BMP antagonists*”, “*BMP 2*”, “*BMP 7*”, “*BMP applications*”.

### 2. Tecido Ósseo

Dentro dos tecidos de suporte existentes, o tecido ósseo é considerado o mais evoluído (Schenk, R.K. 1994), desempenhando funções vitais, assegura a proteção de órgãos essenciais e fornece suporte aos tecidos moles, sendo o principal constituinte do esqueleto (Junqueira, C.L., Carneiro, J. 2008).

Este tecido, é um tipo especializado de tecido conjuntivo, constituído por um grande volume de matriz óssea (ou matriz extracelular calcificada) (Bandyopadhyay, A. et al., 2014), que compreende uma parte inorgânica estruturada por cristais de hidroxiapatita, equivalente a cerca de 50% do seu peso e uma parte orgânica, que é essencialmente constituída por colagénio tipo I (aproximadamente 95%), glicoproteínas e proteoglicanos. Nesta matriz, encontra-se em abundância iões de cálcio e fosfato e várias células:

osteoblastos, osteócitos e osteoclastos (Gruber, R. 2004; Junqueira, C.L., Carneiro, J. 2008).

É a partir de células-tronco que se obtém uma grande variedade de células especializadas que são essenciais para formação de tecidos na embriogénese e na regeneração tecidual (Zhang, J., Li, L. 2005). Pertencentes à linhagem *Mesenchymal stem cells* (MSCs), os osteoblastos, localizam-se na periferia da matriz, sintetizam a sua parte orgânica e contribuem para a mineralização óssea. Quando ficam retidos no interior da matriz, em lacunas ou cavidades, diferenciam-se em osteócitos (Schenk, R.K. 1994; Gruber, R. 2004; Junqueira, C.L., Carneiro, J. 2008). Os osteócitos possuem a capacidade de sentir as forças exercidas no osso e de comunicarem entre si e com outras células (Gurnell, M., Ralston, S.H., Chattrjee, K. 2013), por via de canalículos compreendidos na matriz óssea que permitem a difusão de iões e moléculas, entre os osteócitos e capilares sanguíneos, assim como a comunicação osteócito-osteócito (Schenk, R.K., 1994; Junqueira, C.L., Carneiro, J. 2008).

Os osteoclastos, provém de células hematopoiéticas. São células móveis, gigantes e multinucleadas, que reabsorvem matrizes calcificadas, nomeadamente o tecido ósseo. Estas células, possuem uma parte ativa com prolongamentos que contacta com a superfície óssea e reabsorve-a localmente, através da libertação de ácido ( $H^+$ ), hidrólases e colagenase. A sua atividade é controlada por citoquinas, hormônios (como calcitonina) e um paratormônio (proveniente das glândulas paratireoides) (Schenk, R.K. 1994; Gruber, R. 2004; Junqueira, C.L., Carneiro, J. 2008).

Existem dois tipos principais de osso: osso trabecular (caraterizado pela sua baixa densidade, encontrado no interior de osso longos e apresenta uma taxa de remodelação rápida) e osso cortical (de elevada densidade, representa cerca de 80% do esqueleto) (Gurnell, M., Ralston, S.H., Chattrjee, K. 2013).

O desenvolvimento ósseo ocorre durante a formação do embrião e é formado por dois processos: ossificação endocondral e intramembranosa (Gruber, R. 2004; Junqueira, C.L., Carneiro, J. 2008; Gurnell, M., Ralston, S.H., Chattrjee, K. 2013; Levi, B. et al., 2015).

A ossificação endocondral é característica de ossos longos e curtos. Este tipo, ocorre sobre cartilagem hialina, onde os condrócitos sofrem alterações e posterior apoptose. Subsequentemente, esta cartilagem é substituída por osso devido à infiltração de tecido vascular que contém células osteoprogenitoras, nos locais previamente preenchidos pelos condrócitos (Junqueira, C.L., Carneiro, J. 2008; Gurnell, M., Ralston, S.H., Chattrjee, K. 2013; Levi, B. et al., 2015).

Na ossificação intramembranosa, há diferenciação de MSCs em osteoblastos, como é caso do desenvolvimento da mandíbula e maxila (Gurnell, M., Ralston, S.H., Chattrjee, K. 2013). Este processo ocorre no interior de uma membrana conjuntiva, iniciando-se no centro de ossificação primária. Os osteoblastos sintetizam uma matriz não mineralizada (osteóide), que mais tarde se mineraliza (Junqueira, C.L., Carneiro, J. 2008).

A mineralização do tecido ósseo proporciona dureza ao osso. Esta decorre sobre uma rede formada pelo componente orgânico do osso (Gurnell, M., Ralston, S.H., Chattrjee, K. 2013), envolvendo células pré-osteoblásticas, eventos físico-químicos e uma estrutura constituída por moléculas presentes na matriz orgânica (Carreira, A.C. et al., 2014).

A matriz óssea inclui diversos componentes proteicos (Wozney, J.M. 2002) que participam neste complexo processo, intervindo como fatores de regulação e/ou de nucleação na deposição de cristais de hidroxapatite; desempenhando um papel essencial (Carreira, A.C. et al., 2014).

Os vários fatores de crescimento contidos na matriz óssea responsáveis pela formação e reparação óssea e tecidual, podem ser agrupados de acordo com as suas atividades biológicas: *Fibroblast growth factor* (FGF), *Insulin-like growth factor* (IGF), *Epidermal growth factor* (EGF), *Platelet-derived growth factor* (PDGF) e proteínas pertencentes à

superfamília *Transforming growth factor beta* (TGF- $\beta$ ), como é caso das BMPs (Carreira, A.C. et al., 2014).

A sinalização das BMPs é um processo crucial na regulação da formação endocondral (Bandyopadhyay, A. et al., 2014), estas encontram-se impregnadas na matriz óssea e promovem a formação óssea quando ocorre reabsorção do osso (Gurnell, M., Ralston, S.H., Chattrjee, K. 2013).

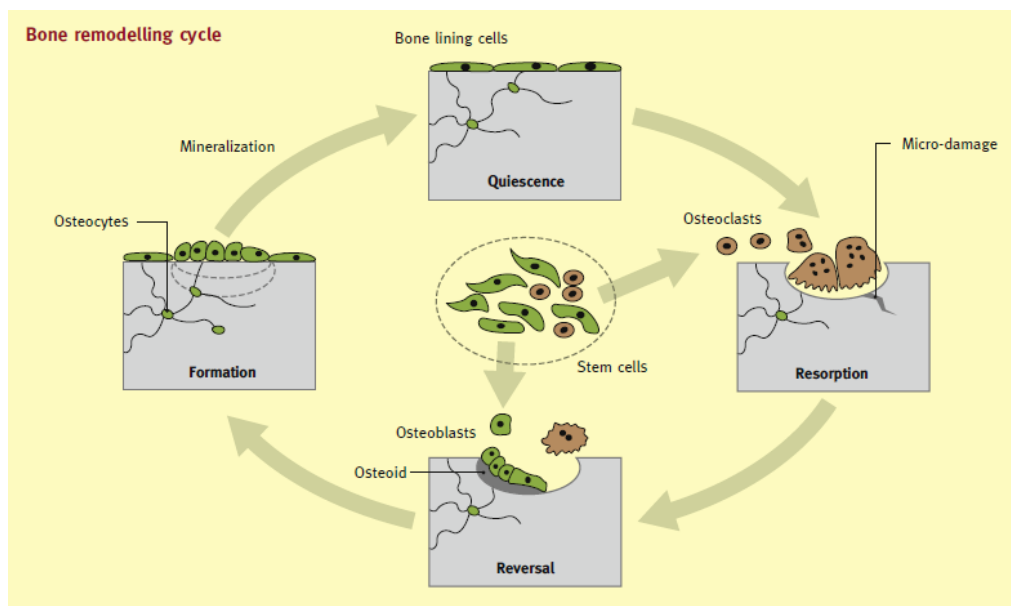
### **2.1. Remodelação/Reparação/Regeneração Óssea**

O tecido ósseo está em constante remodelação ao longo da vida, passando por processos de renovação e reparação (Gurnell, M., Ralston, S.H., Chattrjee, K. 2013). O equilíbrio entre a taxa de reabsorção óssea por parte dos osteoclastos e formação óssea pelos osteoblastos é essencial para a manutenção da massa óssea (Park, D.S. et al., 2012). Este mecanismo passa pela reabsorção parcial de tecido existente e a posterior formação de novo tecido ósseo (Gruber, R. 2004; Junqueira, C.L., Carneiro, J. 2008).

A remodelação óssea é ativada pela tiroide, hormonas de crescimento e hormonas paratiroideas. Quanto à ativação local, esta pode ser ativada por traumas, fraturas e colocação de implantes. Os fatores inibitórios deste processo são a cortisona e calcitonina (Schenk, R.K. 1994).

O processo de remodelação óssea é iniciado pelo recrutamento de células precursoras de osteoclastos ao local, que mais tarde diferenciam-se em osteoclastos através da ativação do *Receptor activator of nuclear factor kappa B* (NF $\kappa$ B), que se encontra na superfície celular. Os osteoclastos maduros agregam-se à superfície óssea iniciam o processo da reabsorção óssea através da libertação de enzimas proteolíticas e ácido clorídrico. No final, os osteoclastos migram, afastando-se da superfície óssea e sofrem apoptose. O encerramento desta etapa dá início a uma nova etapa (fase reversa), a partir da qual ocorre formação óssea (Gurnell, M., Ralston, S.H., Chattrjee, K. 2013).

De seguida sucede-se a proliferação e diferenciação de osteoblastos, formação da matriz e a sua respetiva mineralização (Schenk, R.K. 1994).



**Figura 1:** Ilustração do Ciclo de Remodelação óssea (Gurnell, M., Ralston, S.H., Chattrjee, K. 2013).

Em caso de fraturas, a sua reparação passa pela remoção do coágulo sanguíneo, matriz lesada e células ósseas mortas, por parte dos macrófagos. Em resposta a esta fratura, o perióstio e endóstio próximos à lesão, proliferam, produzindo um tecido enriquecido em células osteoprogenitoras, formando um colar conjuntivo. Este processo continua em desenvolvimento até à formação de um tecido ósseo imaturo, o calo ósseo, que posteriormente é substituído por tecido ósseo secundário (Junqueira, C.L., Carneiro, J. 2008).

Esta formação óssea pode ser incitada pelas BMPs que são expressas em abundância no local onde ocorreu a lesão, iniciando a atração, proliferação e diferenciação de células precursoras de osteoblastos no local lesado (Watzek, G. 2004). Fatores de transcrição, como o *Osterix* (*Osx*), ligam-se a genes osteoblásticos, como *Alkaline phosphatase*

(ALK) e *Osteocalcin* (OC); promovendo a maturação dos osteoblastos (Gurnell, M., Ralston, S.H., Chattrjee, K. 2013). O pico de diferenciação dos osteoblastos ocorre entre dez a onze dias após o início da regeneração (Granjeiro, J.M. et al., 2005). Posteriormente, estas células ósseas depositam-se na matriz óssea descalcificada e promovem a sua mineralização (Gurnell, M., Ralston, S.H., Chattrjee, K. 2013).

Como mencionado anteriormente, o osso é um tecido que possui elevada capacidade de autorreparação após fraturas e encontra-se constantemente em regeneração. Contudo existem situações em que é necessário intervir, como é caso de grandes defeitos de perda óssea que ocorrem devido a traumatismos, infeções e ressecções tumorais (Huang, B.J. et al., 2013). Nestes casos, ocorre regularmente a infiltração de tecido fibroso, o que prejudica e atrasa a regeneração (Shin, H. et al., 2013).

A Regeneração Óssea consiste na reposição de componentes da matriz perdidos, que tem lugar em situações de lesões (como colocação de implantes, defeitos ósseos, fraturas) ou doenças que originaram a perda de tecido (Schenk, R.K. 1994).

A regeneração óssea depende de três fatores: MSCs e osteoblastos, fatores de crescimento e um suporte adequado (*carrier*). (Deschaseaux, F., Obert, L., Garbuio, P. 2005) Dentro destes fatores indutores, é de destacar as BMPs (Schenk, R.K. 1994).

Um bom modelo de estudo para a regeneração óssea são os defeitos ósseos decorrentes da presença de doenças ou lesões, uma vez que estes estão menos sujeitos a fatores mecânicos e obstrução do sistema vascular; contrariamente às fraturas ósseas (Schenk, R.K. 1994; Carreira, A.C. et al., 2014).

Johner et al., em 1972, ao estudar a regeneração de defeitos ósseos na tíbia de coelhos verificou que esta desencadeava-se dentro de poucos dias, sem ocorrência prévia de reabsorção óssea osteoclástica. Fatores condicionantes deste mecanismo são: mecanismos de regulação, diferenciação, proliferação e atividade das células pré-osteoblásticas (que são geridas por diferente fatores de crescimento), assim como o tamanho do próprio defeito (Carreira, A.C. et al., 2014).

### 3. BMPs

O Dr. Marshall Urist, cirurgião ortopédico, iniciou o seu estudo em 1960 (Wozney, J.M. 2002; Granjeiro, J.M. et al., 2005). Em 1965, demonstrou em bolsas de músculo, defeitos ósseos em coelhos e outros vertebrados, ser possível induzir a formação de osso endocondral em sítios ectópicos, usando segmentos de osso desmineralizado e liofilizado (Granjeiro, J.M. et al., 2005; Tomoyasu, A. et al., 2006; Maki, A.J. et al., 2011; Bandyopadhyay, A., Prashar, P., Yadav, P.S. 2013; Carreira, A.C. et al., 2014; Miyamoto, A. et al., 2014). Este doutor provou que uma proteína ou conjunto de proteínas seriam responsáveis por esta formação (Wozney, J.M. 2002; Giannoudis, P.V., Dimitriou, R. 2005). Nos seus estudos, observou a expressão de BMPs nos sítios onde decorreu regeneração óssea (Fuerst, G., Gruber, R. 2004). A formação de osso heterotópico na ausência de perióstio é extremamente vantajosa na reparação e regeneração óssea (Togashi, A.Y. et al., 2007).

A descoberta das BMPs é um marco histórico na evolução da engenharia do tecido ósseo (Wu, G., Guo, J. 2012). Têm sido isoladas, e caracterizadas, a partir da matriz óssea, e a sua atividade é avaliada utilizando vários ensaios biológicos *in vitro* e *in vivo* (Miyamoto, A. et al., 2014). Estas glicoproteínas são fatores de crescimento osteoindutivos com elevado potencial (Park, D.S. et al., 2012), pertencem à superfamília TGF- $\beta$ , sendo o seu maior subgrupo. Até à data foram descobertas mais de vinte BMPs no genoma humano e têm sido agrupadas em subfamílias consoante as suas funções e similaridade (Zhang, J. Li, L. 2005; Kokabu, S. et al., 2012; Carreira. A.C. et al., 2014). Para além destas proteínas serem poderosas indutoras da regeneração da cartilagem e osso, encontram-se envolvidas na formação de várias estruturas e órgãos essenciais para um correto desenvolvimento e crescimento humano (Lee, B.S. et al., 2014).

A família das BMPs é dividida em quatro subfamílias: BMP 2 e -4; BMP 3 e -3B; BMP 5, -6, -7, -8a e -8b; BMP 12, 13 e 14 (Giannoudis, P.V. 2009; Carreira, A.C. et al., 2014).

A BMP 1 apesar de dispor de capacidade indutora de formação de cartilagem tem uma estrutura distinta, pertencendo à família da metaloproteinase e não à TGF- $\beta$  (Granjeiro, J.M. et al., 2005; Carreira, A.C. et al., 2014; Miyamoto, A. et al., 2014).

A BMP 2 durante a diferenciação osteogénica *in vitro* potencializa a expressão genética de marcadores osteogénicos, sendo dentro das várias BMPs uma das mais osteoindutivas (Kobayashi, S. et al., 2009; Li, D. et al., 2012; Huang, B.J. et al., 2013; Lee, B.S. et al., 2014). Esta BMP tem uma ação mais *upstream* que a BMP 7 relativamente à diferenciação celular (especificamente na mobilização celular inicial). A BMP 7 atua na diferenciação óssea (Deschaseaux, F., Obert, L., Garbuio, P. 2005).

### **3.1. Estrutura**

As BMPs são moléculas diméricas que se encontram conectadas por ligações de dissulfureto, sendo, portanto, intrinsecamente proteínas estáveis (Wozney, J.M. 2002). Da sua constituição fazem parte 120 aminoácidos. Possuem um péptido maduro C-terminal, um pró-domínio e ainda um péptido N-terminal hidrofóbico que determina a estabilidade e orienta a proteína para a respetiva via secretora (Carreira, A.C. et al., 2014). São sintetizadas como grandes e inativas proteínas precursoras, intracelularmente. Interagem com a membrana de diversos tipos celulares, atuando como ligandos para os respetivos recetores (Granjeiro, J.M. et al., 2005).

Depois do seu pró-domínio ser clivado proteoliticamente, podem dar origem a BMPs ativas na forma homodímera ou heterodímera (Carreira, A.C. et al., 2014).

A maioria das BMPs maduras são constituídas por uma ligação dissulfeto covalente que une os dois monómeros, quando estes monómeros de um ligando são provenientes do mesmo membro BMP esse ligando é denominado BMP homodímera, por outro lado,

monómeros derivados de BMPs diferentes são BMPs heterodiméricas (Wu, G., Guo, J. 2012).

Estudos *in vivo* e *in vitro*, demonstraram que a forma heterodímera apresenta maior potencial. Como exemplo deste facto temos: a BMP 2/6, BMP 2/7, BMP 2b/7, BMP 4/7 (Carreira, A.C. et al., 2014).

Verificou-se, que quanto menor a homologia genética e proteica entre dois monómeros, maior atividade osteocondutiva a BMP heterodimérica apresenta, tanto *in vitro* como *in vivo*. Para além disso, apresentam afinidade para ambos os recetores, o que conduz à formação mais ágil e estável do complexo recetor-ligando, podendo ainda conduzir a uma maior transcrição de genes alvo e ainda, maior competência na promoção de vias *Smad-Independent*. Estes benefícios conduziram à produção em elevadas quantidades de BMPs recombinantes heterodiméricas, principalmente os subgrupos BMP 2/4 e BMP 5/6/7/8/8b que são estritamente alusivos à regeneração óssea (Wu, G., Guo, J. 2012).

### **3.2. Características e Funções**

A sua síntese ocorre a partir de células osteoprogenitoras, osteoblastos, plaquetas, condrócitos e células endoteliais; sendo que a sua produção não é limitada ao osso (Carreira, A.C. et al., 2014).

Dependendo da especificidade para determinados recetores e da sua respetiva interação, assim como dos distintos tecidos onde são expressas, as diferentes BMPs podem ter uma função distinta ou exercer várias funções (Zhang, J., Li, L. 2005; Hill, C.S., Ramel, M.C. 2012), atuando de forma parácrina ou autócrina (Giannoudis, P.V., Dimitriou, R. 2005). Na sinalização parácrina, a célula sinalizadora atua em várias células que se encontram perto desta. Quanto à sinalização autócrina, a célula sinalizadora interage com substâncias produzidas pela própria, sendo ao mesmo tempo célula alvo (Boundless, 2015).

Consoante a sua concentração podem atuar em diversas células (Simeoni, I., Gurdon, J.B. 2007): algumas linhagens de células pluripotentes, células da medula óssea, células precursoras de osteoblastos, fibroblastos, mioblastos e células neurais. E modulam diversos marcadores ósseos, tais como osteopontina, osteonectina, OC, ALK e o recetor da hormona paratireoide (Granjeiro, J.M. et al., 2005).

Desempenham várias funções, ou seja, são fatores de crescimento multifuncionais, o que constitui um aspeto bastante importante não só na reparação óssea mas também na engenharia dos tecidos. Dentro das suas inúmeras atividades encontram-se a regulação: mitogénica, quimiotática, diferenciadora, osteolítica e migratória de várias células (Hill, C.S., Ramel, M.C. 2012), como é caso da BMP 2 (Zou, G.M. et al., 2014).

Encontram-se envolvidas no incitamento da diferenciação osteoblástica *in vitro* e *in vivo* das células-tronco mesenquimais (Giannoudis, P.V., Dimitriou, R. 2005; Kokabu, S. et al., 2012). Ocorrem complexos eventos celulares após a sua aplicação: infiltração de células mesenquimais, formação de cartilagem, vascularização, formação óssea e remodelação do novo tecido ósseo (Wozney, J.M. 2002). Através da ligação ao recetor BMPRIb, consequentemente induzem, ossificação endocondral/intramembranosa e condrogénese (estudos têm demonstrado que a BMP 4 é um bom promotor da formação de cartilagem e também atua efetivamente na diferenciação da linhagem condrogénica) (Granjeiro, J.M. et al., 2005).

A sua ação generalizada nos osteoblastos passa por um acréscimo da síntese de DNA e transcrição dos respetivos genes implicados na síntese de proteínas da matriz óssea (Granjeiro, J.M. et al., 2005). Esta indução pode ocorrer por parte da BMP 2, -4, -6, -7, -9, -12 e -13; por outro lado a BMP 3 é responsável pela sua proliferação (Carreira, A.C. et al., 2014).

Estudos recentes indicam a possível envolvimento das BMPs na manutenção da massa muscular esquelética normal (Miyamoto, A. et al., 2014).

As BMPs são essenciais para o correto desenvolvimento de várias estruturas que representam o nosso organismo. A análise da sua importância em ratos concluiu que, mutações, deleções ou inativação dos seus genes conduzem a defeitos em vários órgãos (BMP 3 e -7) e podem até mesmo ser letais (no caso da BMP 2 e -4) (Wozney, J.M. 2002; Gruber, R. 2004).

A presença de mutações ou supressão de componentes envolvidas na via de sinalização destas proteínas, poderá dar origem a patologias como: cancro, hipertensão arterial pulmonar, anomalias esqueléticas, telangiectasia hemorrágica hereditária e fibrodysplasia ossificante progressiva (Hill, C.S., Ramel, M.C. 2012). A BMP 7 é ainda expressa em vários tipos de cancro (Park, D.S. et al., 2012).

Participam no desenvolvimento embrionário (desenvolvimento de membros, estrutura craniofacial, modelação do sistema nervoso, formação da crista neural), organogénese, morfogénese dentária, homeostasia da glicose (BMP 9) e modulação da homeostasia do ferro (Carreira, A.C. et al., 2014).

Estudos *in vitro* e *in vivo*, em humanos e ratos, apresentam consistência quanto à eficácia das BMPs na diferenciação de células embrionárias. As BMPs podem exercer forte sinalização de maneira a induzir esta diferenciação, ou podem manter o nível de sinalização baixo permitindo a autorenovação celular, mantendo o equilíbrio necessário para um bom funcionamento (Chen, Y-G., Li, Z. 2013).

### **3.3. BMPS Heterodiméricas**

Uma vez que as BMPs são moléculas diméricas, permitem a formação de BMPs heterodiméricas. Devido à quantidade considerável de BMPs existentes é possível a elaboração de inúmeras combinações, como por exemplo: associar uma subunidade de BMP 2 e outra de BMP 7 (Wozney, J.M. 2002).

Como mencionado anteriormente, as BMPs heterodiméricas recombinantes apresentam inúmeras vantagens relativamente à forma homodimérica, nomeadamente: afinidade para os dois tipos de recetores, menor analogia para antagonistas e uma maior indução de osteogénese *in vivo* quando presentes em doses mais baixas (Wu, G., Guo, J. 2012).

Um estudo recente demonstrou que as BMPs heterodiméricas 2/7 em doses baixas (30 ng/mm<sup>3</sup>) comparadas com as respetivas homodiméricas, suscitaram uma maior espessura trabecular e maior número de trabéculas, trabéculas mais juntas e maior fração de volume ósseo; até seis semanas após o procedimento cirúrgico. Conclui-se que as BMPs heterodiméricas avaliadas na microtomografia computadorizada possuíam capacidade indutora óssea superior às formas homodiméricas e ainda uma estrutura óssea tridimensional mais consistente e madura (Wu, G., Guo, J. 2012).

## **4. Vias de Sinalização e Regulação**

As BMPs interagem com outros fatores de crescimento, constituindo um sistema de sinalização celular de grande complexidade, o qual é controlado temporalmente e espacialmente (Hill, C.S., Ramel, M.C. 2012). Todas as vias de sinalização abaixo descritas estão envolvidas de uma maneira ou de outra na proliferação e diferenciação de MSCs, formação de osso e cartilagem. Para além destas vias e fatores, existem outros envolvidos na sinalização das BMPs que são rigorosamente regulados (Carreira, A.C. et al., 2014).

Características que influenciam os efeitos reguladores das BMPs são: tipos de recetor (recetor BMPR-IA geralmente induz adipogénese, por outro lado, o recetor BMPR-IB encontra-se envolvido na osteogénese), grau de diferenciação, interação entre diferentes proteínas secretadas intracelularmente e extracelularmente, dosagem da BMP (por exemplo, níveis de concentração baixos de BMP 2 conduzem MSCs à formação de adipócitos. Por outro lado, níveis elevados promovem a diferenciação osteogénica (Granjeiro, J.M. et al., 2005; Carreira, A.C. et al., 2014).

As funções das BMPs são exercidas pela sinalização intracelular mediada por um recetor que irá conduzir à posterior transcrição de um gene alvo. Para efetuar esta transcrição, as BMPs podem ativar a via *Smad-dependent* (que é via mais estudada até à data) ou vias *Smad-Independent* (Nohe, A. et al., 2011).

Similar a outros membros da superfamília TGF- $\beta$ , a cascata de sinalização das BMPs é composta por dois recetores transmembranares, quinase serina/treonina, presentes na superfície celular aos quais as BMPs se podem ligar para produzirem os seus efeitos: tipo I e tipo II. Estes recetores são ativados ligando-se a moléculas BMP extracelulares. Tem sido observado que basta o seu recrutamento para induzir a proliferação das células MSCs (Casal, M., Bessa, P.C., Reis, R.L. 2008; Wu, G., Guo, J. 2012; Bandyopadhyay, A., Prashar, P., Yadav, P.S. 2013; Carreira, A.C. et al., 2014; Miyamoto, A. et al., 2014).

As diferentes combinações dos dois tipos de recetores possibilitam sinalizações específicas que conseqüentemente conduzem a diferentes efeitos celulares (Casal, M., Bessa, P.C., Reis, R.L. 2008).

As BMPs homodiméricas e heterodiméricas possuem diferentes afinidades para os dois tipos de recetores. A maioria dos ligandos das BMPs manifestam maior compatibilidade

com os recetores tipo II, enquanto que a afinidade das BMPs é maior para com o recetor tipo I (Hill, C.S., Ramel, M.C. 2012).

#### **4.1. Recetores tipo II**

Os recetores tipo II são constitutivamente ativados e fosforilizados ao ligarem-se às BMPs (Carreira, A.C. et al., 2014), após recrutarem o recetor tipo I, formam um complexo denominado BMP–recetor II—recetor I (Granjeiro, J.M. et al., 2005). Esta categoria inclui os recetores: BMPR–II, ActR–IIA e ActR–IIB (Nohe, A. et al., 2011; Hill, C.S., Ramel, M.C. 2012; Miyamoto, A. et al., 2014).

As BMPs 6 e -7 sob a forma homodimérica, apresentam afinidade superior para estes recetores em relação ao recetor I (Wu, G., Guo, J. 2012).

O recetor BMPRII interage unicamente com os ligandos BMP 2, -4, -6, -7 e -15 (Otsuka, F. et al., 2012). Nomeadamente, a ativação de células alvo da BMP 2, são conduzidas por estes recetores (Zou, G.M. et al., 2014).

#### **4.2. Recetores tipo I**

Os recetores tipo I são os principais envolvidos na sinalização e podem ser subdivididos em ALK1, ALK2, ALK3/BMPR-1A e ALK6/BMPR-1B. Na ausência de ligandos, os recetores tipo I constitutivamente ativados iniciam a sinalização celular. No entanto, os recetores tipo I do *activin*/TGF $\beta$ -1 necessitam dos recetores tipo II para a sua ativação (Miyamoto, A. et al., 2014). Este é o recetor para qual grande parte das BMPs possui maior afinidade, como por exemplo a BMP 2 e -4 homodiméricas que preferencialmente ligam-se ao ALK3 e ALK6; a BMP 6 e -7 aos recetores ALK2 e ALK6. A BMP 2/6 heterodimérica exhibe afinidade para ambos os recetores (Casal, M., Bessa, P.C., Reis, R.L. 2008; Wu, G., Guo, J. 2012, Otsuka, F. et al., 2012; Hill, C.S., Ramel, M.C. 2012).

### 4.3. Via Smad–dependent

Para que se desencadeie a ativação dos recetores I é então necessário que os recetores tipo II promovam a fosforilação no domínio *Glycine-Serine* (GS), na serina e treonina. Esta fosforilação vai manejar a atividade da quinase do recetor I e expor um local de ligação para os principais mediadores desta sinalização, as Smads, que podem constituir dois diferentes grupos de *Receptor-regulated Smads* (R–Smads): Smad1/5/8 e Smads 2/3, que são envolvidas respetivamente nas vias de sinalização das BMPs e *activin/TGF-β* (Tomoyasu, A. et al., 2006; Otsuka, F. et al., 2012; Wu, G., Guo, J. 2012; Hill, C.S., Ramel, M.C. 2012; Kokabu, S. et al., 2012; Chen, Y-G., Li, Z. 2013; Carreira, A.C. et al., 2014).

As Smad1/5/8 são as mais comumente ativadas, esta ativação pode decorrer por parte das BMPs 2, -4, -5, -6, -7, -8b, -9, -10, -12, -13, -14, e -15 (Nohe, A. et al., 2011). Quanto às Smads2/3, podem ser ativadas pelas BMPs 11 e -16 (Casal, M., Bessa, P.C., Reis, R.L. 2008).

As Smads após sofrerem fosforilação na zona C–terminal no domínio MH2, *serine–valine–serine* (SVS) em resposta ao recetor I, vão formar em conjunto com um *common mediator Smad* (co–Smad), Smad 4, complexos heteroméricos que conseqüentemente são conduzidos do citoplasma para o núcleo para ocorrer a transcrição dos genes alvo, como por exemplo: *Inhibitor of differentiation genes* (Id genes) e *Runt–related transcription factor 2* (Runx2). Ocorrendo a ativação da Via Smad (Otsuka, F. et al., 2012; Wu, G., Guo, J. 2012; Hill, C.S., Ramel, M.C. 2012; Kokabu, S. et al., 2012; Chen, Y-G., Li, Z. 2013; Carreira, A.C. et al., 2014).

Genes alvo como os Id genes (Id1, Id2, Id3), são regulados pelas proteínas Smads no espaço de 1h. Estes são fatores de transcrição cruciais para a transdução do sinal extracelular da família TGF–β (Kokabu, S. et al., 2012; Carreira, A.C. et al., 2014;

Miyamoto, A. et al., 2014). O gene *Id2* parece estar envolvido na inibição da diferenciação neural de *Mouse embryonic stem cells* (mESCs) (Zhang, J., Li, L. 2005).

As Smads após o decorrer de algumas horas, ativam indiretamente potentes reguladores da diferenciação de osteoblastos, como o *Runx2*, *Osx* (Kokabu, S. et al., 2012), osteocalcina e ALP (Casal, M., Bessa, P.C., Reis, R.L. 2008).

O complexo *Smad1/5/8* exerce um papel essencial na proliferação celular, controlando estritamente os destinos adipogénicos e osteogénicos. Para estes acontecimentos são necessários dois fatores de transcrição: o *Runx2* regula a osteogénese, potenciando a diferenciação dos osteoblastos e o *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma* (PPAR- $\gamma$ ) regula adipogénese. Este complexo e a sinalização *downstream* da via *Mitogen-activated protein kinases* (MAPK) encontram-se envolvidos na ativação dos recetores da BMP 2, -6, -7 e -9 durante a osteogénese. A ativação do *Runx2* é mediada por dois fatores de transcrição, gene *Distal-less homeobox 5* (*Dlx5*) e *Msh homeobox 2* (*Msx2*), em resposta à sinalização das BMPs (Casal, M., Bessa, P.C., Reis, R.L. 2008; Carreira, A.C. et al., 2014).

Os estágios de diferenciação osteoblásticas que decorrem durante a formação óssea e tecido muscular têm sido estudados através de subclones de *Mouse myoblast cell line* (C2C12). Quando se conjugam estas células com as BMPs 2, -4, -6 e -7, a diferenciação osteoblástica é promovida através da sinalização das *Smads1/5/8*, por outro lado a diferenciação de mioblastos é inibida (Otsuka, F. et al., 2012).

A indução óssea por parte dos recetores BMP tipo I foi estudada em células C2C12. Verificou-se que a superexpressão da forma constitutivamente ativa de ALK2, ALK3 ou ALK6 nestas células induziu um fenótipo osteoblástico, sem a intervenção das BMPs.

Isto indica que a indução da atividade óssea das BMPs é controlada diretamente pelos recetores do tipo I (Miyamoto, A. et al., 2014).

#### 4.4. Vias Smad-Independent

As BMPs também podem exercer a sua sinalização por intermédio de vias independentes da Smad, podendo ativar as vias MAPK: *p38 MAPK* (p38), *Jun n-terminal kinase* (JNK) e *Extracelular signal-regulated kinase* (ERK); estas vias podem ser desencadeadas tanto pelas BMPs, como pelo stress ambiental. A via MAPK, exerce controlo no destino celular de várias células e constitui uma via alternativa para a sinalização da BMP 2 (Zou, G.M. et al., 2014). Esta parece modular a atividade da sinalização BMP-Smad, inibindo-a, através da fosforilação o domínio central presente nas Smads, o qual conecta os domínios MH1 e MH2. Consequentemente a expressão dos genes alvo das BMPs é bloqueada (Verheyen, E.M. 2007; Casal, M., Bessa, P.C., Reis, R.L. 2008; Kokabu, S. et al., 2012; Carreira, A.C. et al., 2014).

O *X-linked inhibitor of apoptosis protein* (XIAP) vincula-se ao recetor da BMP (BMPRI) para sinalizar a *TGF $\beta$ 1-activated tyrosine kinase 1* (TAK1), que posteriormente ativa as vias JNK, p38 e *Nuclear factor-kappaB* (NF-kB). A TAK1, interage com as Smads, interferindo com a diferenciação das células osteoprogenitoras e a respetiva sinalização das BMPs nestas células (Casal, M., Bessa, P.C., Reis, R.L. 2008; Nohe, A. et al., 2011; Carreira, A.C. et al., 2014). Esta via é ainda envolvida na interação entre as proteínas morfogenéticas ósseas e a via *Wnt* (Zhang, J., Li, L. 2005).

Nas vias MAPKs, pode suceder-se regulação por parte da modulação da atividade do domínio SH3 da R-Smad, uma vez que esta liga-se à Smad6, que por sua vez inibe a interação com BMPRI ou provoca um decréscimo da Smad1 através da sua fosforilação no núcleo (Carreira, A.C. et al., 2014).

A diferenciação miogénica é promovida pela fosforilação das vias MAPK e *Phosphatidylinositol 3-kinase* (PI3K). A via MAPK é ainda requisitada para a condrogénese e adipogénese. Um estudo procedido por Ventura, F. et al., (2002) em células de ratos, C2C12, permitiu esclarecer a ação destas vias na presença da BMP 2. Verificou-se que o bloqueio destas cascatas estimula a diferenciação osteoblástica, nomeadamente, a posterior expressão de osteocalcina e ALK.

Várias citocinas e fatores de crescimento, nomeadamente o FGF, EGF e o IGF, podem comunicar-se com as vias MAPK e inibir a sinalização da via *Smad-dependent* concretizada pelas BMPs, através da indução da cascata Ras/Raf/Mek/Erk. (Casal, M., Bessa, P.C., Reis, R.L. 2008; Carreira, A.C. et al., 2014). Este Erk uma vez activado, pode inibir a translocação nuclear da Smad, devido ao comprometimento da região de ligação da Smad1, fosforizando-a. Por outro lado a atividade exercida pelo Erk pode ser inibida pela cascata BMP/TAK1, inibindo consequentemente a diferenciação neural. A relação de antagonismo entre estas vias é essencial para o bom funcionamento das MSCs (Zhang, J., Li, L. 2005).

A Via da Ubiquitinação através da *Smad ubiquitin ligase* (Smurf1) modula a sinalização das BMPs, degradando as Smads por via de um proteossoma (Kokabu, S. et al., 2012), o que condiciona a entrada das Smads no núcleo, ficando retidas no citoplasma. As Smurfs juntamente com a Smad6 criam um complexo que interage com o recetor tipo I, promovendo a sua ubiquitinação e degradação (Verheyen, E.M. 2007; Bessa, P.C., Casal, M., Reis, R.L. 2008).

#### **4.5. Crosstalk com outras Vias de Sinalização**

Como descrito anteriormente, a sinalização das BMPs constitui um elaborado enredo com inúmeros intervenientes, onde coexistem durante o desenvolvimento diversas vias de sinalização. Estas vias podem modular o comportamento umas das outras através de

*crosstalk* (Verheyen, E.M. 2007). Várias vias conseqüentemente irão determinar, de certa forma, processos e efeitos celulares, tais como: inibição da diferenciação miogénica e a maturação osteoblástica (Casal, M., Bessa, P.C., Reis, R.L. 2008).

A via *activin*/TGF $\beta$  e as BMPs competem entre si devido à partilha de moléculas sinalizadoras idênticas, como a Smad4. Em adição, esta via induz *Inhibitory Smads* (I-Smads) em células diferenciadoras pré-osteoblásticas, o que pode afetar a sinalização das BMPs (Casal, M., Bessa, P.C., Reis, R.L. 2008).

As seguintes vias, também podem relacionar-se de maneira antagonista ou sinérgica com a via BMP-Smad: via *Notch*, via *Leukemia inhibitory factor* (LIF), via *Wnt*, via EGF, via IGF e FGF (Casal, M., Bessa, P.C., Reis, R.L. 2008).

As vias LIF ou FGF regulam o p38 e Erk, que exercem um papel fundamental na indução da diferenciação das células embrionárias (Zhang, J., Li, L. 2005).

Vários membros da família gene BMP tem sido apontados como alvos da via de sinalização *Sonic Hedgehog* (SHH). A sua regulação consiste na interferência das atividades de sinalização das vias *Wnt* e FGF (Carreira, A.C. et al., 2014).

Existem ainda estudos baseados em culturas celulares, que apontam para uma possível comunicação entre a sinalização SHH e BMPs, resultando numa diferenciação de MSCs em células osteogénicas. Em acréscimo, num estudo que usou como modelo um rato, verificou-se que a comunicação sinérgica entre as duas vias suprime a condrogénese e promove a diferenciação osteoblástica (Bandyopadhyay, A., Prashar, P., Yadav, P.S. 2013).

#### 4.6. Antagonistas

De maneira a regular e controlar a ação das BMPs, a expressão endógena de antagonistas extracelulares e intracelulares pode ser regulada positivamente de maneira a suprimir a atividade destas proteínas (Wu, G., Guo, J. 2012; Bandyopadhyay, A., Prashar, P., Yadav, P.S. 2013).

Estes antagonistas, podem-se ligar aos recetores das BMPs ou até mesmo apoderarem-se dos seus ligandos, bloqueando conseqüentemente a transdução do sinal. São também capazes de promoverem ou restringirem a sua difusão através da membrana celular. Por outro lado, a sinalização das BMPs poderá ocorrer se alguns inibidores forem alvo de proteólise, mantendo-se um desempenho equilibrado da sua ação (Hill, C.S., Ramel, M.C. 2012; Carreira, A.C. et al., 2014). As formas heterodiméricas e homodiméricas das BMPs respondem de maneira distinta a diferentes antagonistas extracelulares (Wu, G., Guo, J. 2012).

São inumerados mais de quinze antagonistas das BMPs e subdividem-se em quatro grupos: família *Neublastoma* (Dan, PRDC/GRem2, *Gremlin*, *Cerberus*/Cer1, *Coco*/Dand5, *Caronte*, USAG-1, *Sclerostin*/ SOST, *Dante*/DTE); *Twisted Gastrulation* (Tsg); família *Chordin* (*Chordin*, *Ventroptin* /Chordin-like-1/Neuralin 1, *Chordin-like-2*, *Kielin*, *Nel*, *Crossveinless2*/BMPER, *Brorin*, *Brorin-like*, *Noggin*) e família *Follistatina* e FLRG (Carreira, A.C. et al., 2014 *vs* Bragdon, B. et al., 2011).

Sendo os antagonistas mais comuns: *Chordin* (Chd) e *Crossveinless2*, *Noggin*, *Gremlin*, *Cerberus* e *Twisted gastrulation* (Bandyopadhyay, A., Prashar, P., Yadav, P.S. 2013).

O mecanismo de regulação celular das BMPs foi estudado nos seguintes organismos: ratos transgênicos, *Drosophila* e embrião de peixe-zebra. Verificou-se que nestes dois últimos modelos de estudo, o Chd ligou-se extracelularmente às BMPs, impossibilitando

a sua ligação aos respetivos recetores, resultando num desempenho insignificante destas. Nos três modelos verificou-se ainda que uma expressão em demasia do *Crossveinless2* levou à inibição da atividade das BMPs (Hill, C.S., Ramel, M.C. 2012).

O *Noggin* é um polipéptido imprescindível à limitação da atividade das BMPs (Zhang, J., Li, L. 2005), nomeadamente da BMP 2 e -4 (Li, D. et al., 2012). Reduz a fosforilação das Smads (Chen, Y-G., Li, Z. 2013) e é limitadamente expresso por osteoblastos. A sua ação condiciona a condrogénese, inibe a ossificação membranosa e impede o desenvolvimento dos membros através do bloqueio da ligação das BMPs aos seus respetivos recetores (I e II), tanto em células osteoblásticas diferenciadas, como indiferenciadas. Contrariamente à sinalização das BMPs, induz diferenciação neural (Wu, G., Guo, J. 2012). Este antagonista e o *Gremlin* lesam a formação óssea (Chen, Y-G., Li, Z. 2013; Carreira, A.C. et al., 2014). A BMP 2 e -7 homodiméricas podem ser consideravelmente antagonizadas pelo *Noggin*, enquanto o seu efeito é quase nulo na forma heterodimérica (Wu, G., Guo, J. 2012).

Li, D. et al., (2012) estudaram o efeito do *Noggin* na diferenciação osteoblástica de células da polpa dentária, induzida pela presença de BMP 2. Verificaram a inibição da fosforilação das Smads e consequentemente dos marcadores da diferenciação osteoblástica, incluindo o ALP.

A BMP 3 e BMP 15 atuam também como antagonistas (Carreira, A.C. et al., 2014).

A BMP 3 é a BMP mais afluente no osso e exerce um efeito modulador negativo neste (Wozney, J.M. 2002). É plausível que a BMP 3 modele *in vivo* a atividade osteogénica de outras BMPs, visto que é a BMP que existe em maior número no osso desmineralizado (Granjeiro, J.M. et al., 2005). É a única BMP renomada como inibidora da angiogénese através da inibição da BMP 2 (Bandyopadhyay, A., Prashar, P., Yadav, P.S. 2013). Esta

BMP liga-se ao recetor tipo I, ALK4, competindo com o ActR–IIB e provocando um decréscimo da fosforilação das Smads; esta ação possibilita o impedimento da sinalização das BMPs (Casal, M., Bessa, P.C., Reis, R.L. 2008).

Otsuka, F. et al., (2012) investigaram *in vitro* o mecanismo pelo qual a BMP 3B interage com a diferenciação osteoblástica induzida pelas BMPs (-2, -4, -6 e -7). Verificaram que a BMP 3 anula significativamente os níveis dos marcadores osteoblásticos (Runx2, osteocalcina, colagénio tipo 1) induzidos pelas BMPs referidas anteriormente. Quando usada como co-tratamento suprimiu a via Smad1/5/8. Por outro lado, a BMP 3 ativou diretamente a fosforilação da Smad2/3, contrariamente à BMP 2, que impede a ativação desta sinalização. Estes autores, concluiriam que a BMP 3B age como um inibidor da diferenciação osteoblástica, no qual esta proteína e a BMP 2 são mutualmente antagonistas, possivelmente competindo pela Smad4, uma vez que esta é a única co-Smad comum à via de sinalização da via das BMPs e da *activin*/TGF- $\beta$ .

#### **4.7. Co-Receptores / Proteínas Regulatórias Intracelulares**

Diversas células foram rastreadas devido à sua elevada resposta *in vitro* à BMP2, de maneira a compreender melhor o processo de sinalização intracelular (Miyamoto, A. et al., 2014).

Inúmeros moduladores da via de sinalização das BMPs foram mencionados, a sua ação pode ser na superfície da célula ou no citoplasma, e podem promover ou restringir a atividade da sinalização das BMPs, denominando-se como co-recetores (Nohe, A. et al., 2011; Bandyopadhyay, A., Prashar, P., Yadav, P.S. 2013).

É importante conhecer o maior número possível de fatores que podem suprimir, ou potenciar, a atividade das BMPs de maneira a aumentar a sua resposta e sinalização endógena na aplicação tópica, melhorando a sua performance (Kokabu, S. et al., 2012).

As moléculas presentes na membrana podem atuar de maneira a agilizar a difusão passiva das BMPs ou impedindo a sua sinalização ao retê-las no exterior da membrana (Hill, C.S., Ramel, M.C. 2012). As I-Smads, Smad6 e Smad7, bloqueiam a ativação do recetor tipo I após as BMPs se ligarem a este, impedindo a formação do complexo entre as R-Smads e a Co-Smad; exercendo uma regulação negativa sob a via Smad sinalizada pelas BMPs (Li, D. et al., 2012; Miyamoto, A. et al., 2014). A Smad7 inibe ainda a sinalização via TGF $\beta$ -ctivin (Casal, M., Bessa, P.C., Reis, R.L. 2008).

O *BMP and Activin Membrane-Bound Inhibitor* (BAMBI) atua como um pseudorecetor na membrana celular, impedindo a difusão das BMPs para o interior da célula, uma vez que origina um complexo com os recetores II (Nohe, A. et al., 2011; Hill, C.S., Ramel, M.C. 2012).

Citoquinas como o *Tumor necrosis factor alpha* (TNF- $\alpha$ ) e *Interleukin-1 beta* (IL-1 $\beta$ ), presentes nos processos inflamatórios, inibem a diferenciação osteoblástica e formação óssea, provocando diminuição na densidade mineral do osso e ativando os osteoclastos (Zou, G.M. et al., 2014), provocando uma reabsorção óssea exagerada (Otsuka, F. et al., 2007).

Otsuka, F. et al., (2007) conduziram um estudo em células C2C12 para examinar os efeitos do TNF- $\alpha$  na diferenciação osteoblástica induzida pelas BMPs 2, -4, -6, -7. Observaram que a indução de OC e Runx2 foi suprimida em resposta à dose utilizada. Concluíram que o TNF- $\alpha$  suprimiu a via BMP-Smad1/5/8. Esta inibição está relacionada com a ativação da via SAPAK/JNK e *upregulation* da Smad6, evitando assim a diferenciação osteoblástica das células C2C12.

Também em células C2C12, Zou, G.M. et al., (2014) estudaram o efeito destes fatores inflamatórios na presença de BMP 2. Tal como a BMP 2, estes fatores também ativam a

via MAPK, mas exercem um efeito contraditório. Através da sinalização da via p38 e Erk1/2, estas citocinas inflamatórias reduzem a diferenciação osteoblástica por parte da BMP 2 e a respetiva expressão do Runx2.

Elevada atividade da ALP, expressão da hormona paratiroide (PTHrP) e osteocalcina, são características osteoblásticas induzidas pela BMP 2 nas células C2C12 (relacionada com a indução de osso heterotópico); contrariamente à TGF- $\beta$ 1 (Granjeiro, J.M. et al., 2005; Miyamoto, A. et al., 2014).

O sinergismo entre BMPs e outras moléculas ainda não são claros. No entanto, alguns estudos apontaram que uma combinação de TGF-1, TGF-2 ou activina com BMP 2 são potentes indutores de osso heterotópico *in vivo*. Assim como o *Osteoglycin* (OGN) aumenta a atividade indutora da BMP 2 (Miyamoto, A. et al., 2014).

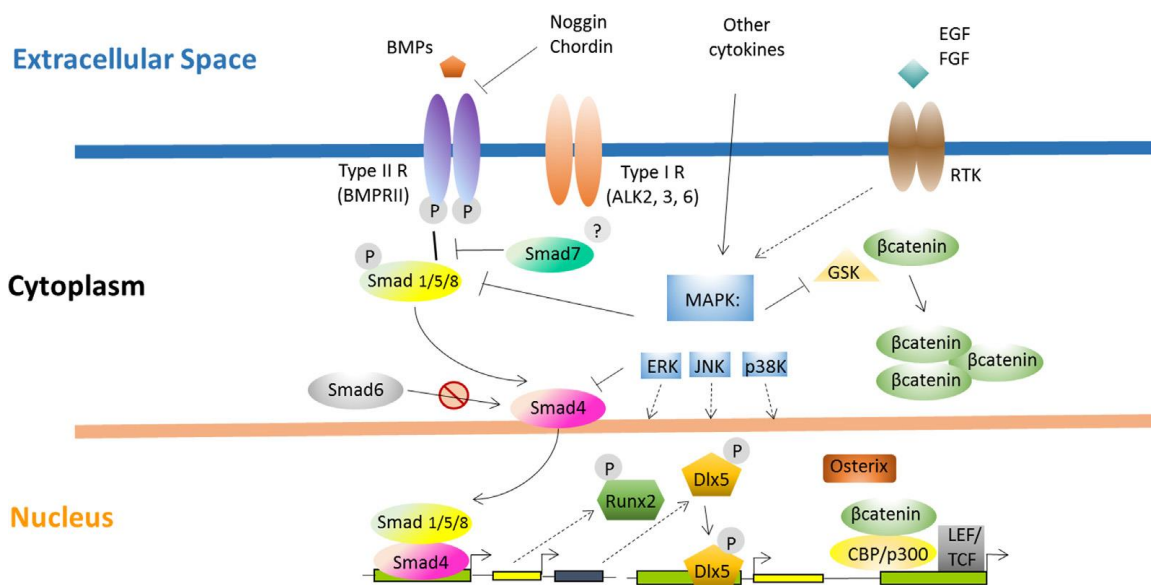
As moléculas Sinvastatina e Estatina são ativadoras da sinalização das BMPs. Estimulam a expressão da BMP 2, proporcionando a consolidação de fraturas em modelos de rato (Bandyopadhyay, A., Prashar, P., Yadav, P.S. 2013).

Quando há expressão e ativação do Runx2, a expressão de genes indutores da diferenciação osteoblástica é aumentada, Osx, ALP e OC, sendo este um importante elemento na diferenciação osteoblástica, para além que atua como *downstream* da sinalização das BMPs (Kokabu, S. et al., 2012).

Fosfatases como a *Small C-terminal domain phosphatases* (SCPs) e *Protein phosphatase magnesium-dependent 1A* (PPM1A) são afluentes no osso e parecem suprimir a atividade osteoblástica induzida pelas BMPs. Estimulam a desfosforilação das Smads e dos genes OC, Osx e ALP. Quanto à restrição da expressão do Runx2 e Id genes, apenas a PPM1A apresentou efeitos; a SPC1 atua nos elementos *downstream da Runx2* (OC, Osx e ALP).

Estes factos indicam que estas duas fosfatases intervêm em diferentes estádios da diferenciação osteoblástica (Kokabu, S. et al., 2012; Miyamoto, A. et al., 2014).

É de destacar a necessidade de compreender na íntegra o mecanismo de interação entre as BMPs e todas as moléculas. A sua compreensão integral iria conduzir a um grande progresso, principalmente na área da saúde: desenvolvimento de terapias ou até mesmo extinguir os sintomas associados. Mutações no recetor BMP tipo I, Alk3, em humanos têm sido associadas à síndrome polipose juvenil, assim como alguns antagonistas das BMPs têm sido associados a doenças como: fibrose e braquidactilia (Hill, C.S., Ramel, M.C. 2012). Desiquilíbrio na atividade das BMPs coopera ainda na ocorrência de cancro (Verheyen, E.M. 2007).



**Figura 2:** Elucidação de algumas vias de Sinalização das BMPs (Smad–dependent e Smad–independent) e a sua respetiva regulação. É de notar o crosstalk existente entre as diferentes vias, assim como, a presença de antagonistas (Noggin e Chordin), citocinas e fatores reguladores e ainda fatores de transcrição resultantes da respetiva transdução do sinal. (Carreira, A.C. et al., 2014)

## 5. Aplicações

Grandes defeitos ósseos provocados por ressecção de cancro ou trauma, constituem um desafio clínico (Dinopoulos, H., Giannoudis, P.V. 2007). No sentido de reparar estes defeitos, é prática usual a utilização de enxertos de osso autólogo, devido às suas incríveis propriedades osteogênicas, osteoindutivas e osteocondutivas. Apesar das suas vantajosas características, o seu uso poderá tornar-se restrito devido à sua limitada quantidade, taxa de reabsorção irregular, morbidade da área dadora, relutância em reproduzir a curvatura de certas áreas recetoras (Wu, G., Guo, J. 2012), interferência na atividade das células MSCs devido à idade do dador, dor crónica, parestesia (Shimidmaier, G., Calori, G.M., Blokhuis, T.J. 2013), estética, hemorragia (Liu, C. et al., 2013), elevado tempo de operação e permanência no hospital, hematoma, infeção e lesão iatrogénica do nervo (Giannoudis, P.V. 2009). Contudo, continuam a ser a técnica “*gold standard*” utilizada em defeitos ósseos (Dinopoulos, H., Giannoudis, P.V. 2007; Maki, A.J. et al., 2011; Faggetti, A. et al., 2013).

De maneira a contornar estas desvantagens, o uso de materiais sintéticos, aloenxertos e xenoenxertos tornou-se uma prática clínica corrente. No entanto, de uma forma geral estes materiais não apresentam osteoindutividade (Wu, G., Guo, J. 2012).

A estimulação da diferenciação de MCSs em osteoblastos *in vitro* foi totalmente conseguida pelas BMPs 2, -4 e -7 (Biase, P.D., Capanna, R. 2005), pelo que a sua capacidade osteoindutiva e osteocondutiva têm sido testadas em vários estudos (Giannoudis, P.V. 2009).

As BMPs constituem uma alternativa ao uso de materiais autólogos, sendo fatores de diferenciação, incitam a formação do próprio osso do hospedeiro (paciente) com uma dose de cerca de 12mg por tratamento (Wozney, J.M. 2002; Huang, B.J. et al., 2013).

Quando usadas em vários animais para reparação óssea, demonstraram resultados encorajadores (Giannoudis, P.V., Dimitriou, R. 2005; Kobayashi, S. et al., 2009).

Wozney, J.M. (2002), considera que na escolha da BMP existem aspetos importantes a ter em conta. A concentração da BMP no produto, pureza, disponibilidade sistémica, atividade localizada, segurança, biocompatibilidade, imunogenicidade, assim como o método de aplicação, são características que ditam a sua eficácia.

Vários estudos *in vitro* e *in vivo* provaram que as BMPs são potentes fatores de crescimento, oferecendo bons resultados no que diz respeito à regeneração óssea (Faggetti, A. et al., 2013), nomeadamente no preenchimento de defeitos provocados por doença periodontal e maxilomandibulares (Togashi, A.Y. et al., 2007), sendo os mais efetivos na cura/cicatrização da fusão vertebral, fraturas, implantes dentários.

Somente as BMP 2 e BMP 7 recombinantes carregadas em membranas reabsorvíveis de colagénio (Casal, M., Bessa, P.C., Reis, R.L. 2008; Huang, B.J. et al., 2013), estão disponíveis para uso clínico, tendo sido aprovadas pela FDA respectivamente, em 2001, a BMP 7 com o nome comercial OP-1 Implant<sup>®</sup> (tratamento de fusão espinal e possibilidade do seu uso em cirurgias dentárias e ortopedia) (Granjeiro, J.M. et al., 2005); esta aprovação surgiu do primeiro *Randomized controlled trial* (RCT) acerca desta BMP. Este estudo foi conduzido por Friedlaender et al., (2001) onde demonstrou não haver diferenças significativas entre o desempenho da BMP 7 e enxertos autólogos, durante nove meses em fraturas da tíbia não cominutivas. É de frisar ainda que, no grupo onde foram utilizados os enxertos verificou-se uma maior percentagem de dor crónica (Shimidmaier, G., Calori, G.M., Blokhuis, T.J. 2013).

Subsequentemente em 2002, a BMP 2, foi aprovada com o nome comercial InductOS<sup>®</sup> (tratamento de fratura aguda da tíbia) e InFUSE<sup>®</sup> (tratamento da fusão da espinha

vertebral na zona inferior) e ainda em reconstruções maxilofaciais (Zou, G.M. et al., 2014). A BMP 2 apresentou benefícios nas possíveis complicações do processo cicatricial. A produção destas BMPs recombinantes ocorre nas células *Chinese hamster ovary* (CHO) (Carreira, A.C. et al., 2014).

Observou-se que a rhBMP7 *in vitro* promove inicialmente proliferação de condrócitos e induz a sua diferenciação. Durante o decorrer do tratamento, estimula a proliferação celular de osteoblastos em diferentes estadios de diferenciação, síntese de colagénio e osteocalcina e indução de ALK. Em estudos realizados em animais com defeitos osteoperioestais segmentados, sucedeu-se ossificação endocondral (Granjeiro, J.M. et al., 2005).

Mais tarde, em 2004 conjugou-se a rhBMP2 com uma membrana reabsorvível de colagénio (esta tem a função de reter a BMP, permitindo uma libertação mais controlada) (Zou, G.M. et al., 2014) no tratamento de fratura aguda aberta da diáfise da tíbia e, em 2009, usou-se rhBMP7 no tratamento de espondilolistese (Carreira, A.C. et al., 2014).

A rhBMP2 potencia uma rápida diferenciação dos osteoblastos, impedindo a diferenciação das células precursoras em adipócitos e mioblastos, aumentando a concentração de marcadores ósseos (Granjeiro, J.M. et al., 2005); culminando na formação de osso endocondral (Wozney, J.M. 2002).

A aplicação de 1,5mg/mL de rhBMP2 numa membrana de colagénio absorvível em quatrocentos e cinquenta pacientes com fraturas expostas da tíbia, desempenhou melhores resultados do que o tratamento padrão. Houve menos ocorrência de intervenções secundárias, decréscimo na taxa de infeção e uma cicatrização mais agilizada (Granjeiro, J.M. et al., 2005).

Burkus et al., conduziu um estudo com o uso de rhBMP2, que envolveu seiscentos e setenta e nove pacientes. Concluíram que apesar da duração da cirurgia e as suas complicações os resultados foram estatisticamente satisfatórios. (Granjeiro, J.M. et al., 2005)

Com o interesse crescente nestas proteínas procurou-se criar um sistema de produção que possibilita-se rentabilizar e manter as propriedades e qualidades das BMPs íntegras. Deste modo, abandonou-se o método de purificação das BMPs através de uma matriz óssea bovina, pois este processo demonstrou ser ineficiente (rendimento reduzido) (Granjeiro, J.M. et al., 2005) e engenhoso, com um acréscimo dos riscos implicados no uso clínico de um material alogéneo (Carreira, A.C. et al., 2014).

Hoje em dia recorre-se à utilização de proteínas recombinantes BMP 2 (rhBMP2) e BMP 7 (rhBMP7), onde a clonagem, expressão e purificação decorrem a partir de vários sistemas de expressão: bactérias (*Escherichia Coli*), leveduras (*Pichia pastoris methylotrophic*), sistema de baculovírus/ células de inseto (*Spodoptera frugiperda*) e células de mamífero (que parece ser o sistema mais vantajoso) (Carreira, A.C. et al., 2014).

A tecnologia de DNA recombinante produz proteínas bem caracterizadas com um eminente grau de pureza e atividade consistente (Wozney, J.M. 2002). A produção individual destas proteínas permitiu reconhecer a sua capacidade osteoindutiva (Dinopoulos, H., Giannoudis, P.V. 2007). No entanto, a produção através de células de mamífero ainda é bastante dispendioso. Apesar da tecnologia recombinante encontrar-se numa etapa inicial, espera-se avanços que permitam a produção em larga escala através de bactérias, diminuindo o seu custo (Casal, M., Bessa, P.C., Reis, R.L. 2008).

Existem estudos que comparam a *performance* dos dois sistemas (BMPs purificadas e recombinantes), dos quais um utilizou como base da avaliação o conteúdo de iões de cálcio e a aparência radiográfica do osso tratado com ambas as proteínas. Evidenciou-se que a maturação do tecido ósseo ectópico em músculos de rato, foi dez vezes superior quando eram aplicadas proteínas purificadas (Carreira, A.C. et al., 2014). Este resultado talvez fosse possível devido às diferenças existentes em ambos os processos a testar, na sua sequência de aminoácidos, para além disso, o tipo de transportador usado para as BMPs é um fator importante, que pode ou não ditar o sucesso das mesmas (Granjeiro, J.M. et al., 2005).

Resumindo, as principais aplicações das BMPs estão associadas a anomalias do desenvolvimento com elevada perda óssea, defeitos ósseos originados por processos inflamatórios ou infecciosos e traumas (Santos, A.A. et al., 2005).

### **5.1. Aplicações em Medicina Dentária**

O conhecimento dos mecanismos envolvidos na sinalização das BMPs e a criação de veículos apropriados para seu uso clínico irá desencadear uma evolução na área da Medicina Dentária (Granjeiro, J.M. et al., 2005). Para clinicamente se obterem os efeitos pretendidos, é necessário associar as BMPs a um sistema de libertação controlado de maneira a que não se advenha a sua difusão sistémica, mantendo a sua atividade biológica apenas no local pretendido (Carreira, A.C. et al., 2014). Neste sentido, a engenharia de tecidos ósseos, têm estudado *scaffolds* apropriadas para conter as BMPs (Park, D.S. et al., 2012).

Vários estudos tem sido realizados em animais de forma a avaliar o desempenho das BMPs no aumento do seio maxilar (Granjeiro, J.M. et al., 2005). A rhBMP2, promove esta elevação, assim como a regeneração do ligamento periodontal (Togashi, A.Y. et al., 2007). Tem sido testadas em procedimentos endodônticos (pulpotomias), regeneração de

perda óssea implicada na doença periodontal e aumento ósseo para colocação de implantes (Granjeiro, J.M. et al., 2005).

Em defeitos intraósseos em cães usou-se rhBMP2 em associação a uma espuma de colagénio, verificou-se um incremento na formação óssea sem ocorrências de reabsorção e outros efeitos laterais (Granjeiro, J.M. et al., 2005).

Também em cães, foi usada BMP 2 para preservação do alvéolo pós-extração, preenchimento de um *gap* existente entre um implante e o osso alveolar, defeitos mandibulares bilaterais e aumento do seio maxilar; em todos os estudos o tratamento foi bem sucedido, ocorrendo regeneração óssea (Fuerst, G., Gruber, R. 2004).

Num ensaio clínico constituído por seis pacientes, dos quais três foram utilizados como grupo controlo, numa cirurgia da elevação do seio maxilar administrou-se rhBMP7 (2,5mg em 1g de membrana de colagénio), que exibiu no espaço de seis meses após a intervenção cirúrgica potencial de formação óssea. Contudo, o comportamento deste material apresenta algumas irregularidades (Granjeiro, J.M. et al., 2005).

Estudos em implantes de titânio comumente com BMP 2, demonstraram um processo de osseointegração mais ágil, desempenhando uma rápida formação óssea, assim como melhor penetração do osso nas porosidades presentes no implante. Em implantes de titânio de superfície rugosa, verificou-se um aumento da atividade da ALP e da produção de osteocalcina. A aplicação de BMP 2 e -7 promove um aumento da altura alveolar vertical e da cortical, sendo a neoformação óssea, de trabeculado e densidade semelhantes ao osso normal em defeitos alveolares (Togashi, A.Y. et al., 2007).

Vários estudos executados por diferentes autores foram dirigidos de maneira a estabelecer uma linha de comportamento da aplicação das BMPs em defeitos de furca tipo III e

aumento da crista óssea para posterior implantação de implantes. Apesar dos resultados terem sido promissores são insuficientes para a condução de uma meta análise de forma a esclarecer a viabilidade destes fatores de crescimento (Granjeiro, J.M. et al., 2005).

As BMPs foram testadas no capeamento da polpa, desempenhado uma eficaz barreira mineralizada. Jepsen et al., (1997) usaram para este fim rhBMP7 em porcos de porte pequeno, o resultado obtido comparado com uso de hidróxido de cálcio foi superior, verificando-se uma barreira de dentina mais espessa no grupo tratado com a BMP 7. Ren et al., (1999) testou o mesmo procedimento, mas usou rhBMP2 e os resultados também foram melhores (Granjeiro, J.M. et al., 2005).

A BMP 2 induz a diferenciação de *Dental pulp cells* (DPCs), através do controlo da Smad1 e 5, sendo portanto um elemento necessário para uma adequada mineralização e desenvolvimento do esmalte. *In vivo*, esta BMP estimula a formação de dentina reparadora em polpa amputada. Este facto depois de devidamente explorado, poderá no futuro potencializar as práticas conservadoras em Medicina Dentária (Li, D. et al., 2012).

Existem estudos que demonstram a capacidade da BMP 2 em estimular a regeneração óssea e de tecidos periodontais *in vivo*, inclusive, a junção desta BMP com células do ligamento periodontal. Lee, B.S. et al., (2014), demonstrou que a BMP 2 incita a diferenciação osteogénica das células periodontais, apresentando-se como uma boa opção para o tratamento de defeitos periodontais. Para este efeito usou como material de suporte para a proliferação e diferenciação destas células um sistema de libertação da BMP 2, um polímero *Polycaprolactone* (PCL) heparinizado, este é biocompatível e biodegradável, usando comumente em aplicações biomédicas e aprovado pela FDA. Ao final de dez a catorze dias, a deposição de cálcio foi significativamente elevada na membrana que possuía BMP 2 em relação à membrana de controlo, assim como, a expressão de marcadores de diferenciação osteoblástica (Lee, B.S. et al., 2014).

É necessário a realização de mais ensaios clínicos corretamente dirigidos, randomizados e cegos, para elucidar a eficácia das aplicações clínicas das BMPs nesta área (Granjeiro, J.M. et al., 2005).

## **5.2. Futuras Aplicações**

Mutações nos recetores das BMPs podem causar doenças. Mutações no gene *BmprII* foram observadas em pacientes com hipertensão pulmonar primária, em pacientes com polipose juvenil foram encontradas mutações no gene *BmprIA* (Casal, M., Bessa, P.C., Reis, R.L. 2008).

As BMPs podem inibir ou induzir a tumorigénese do cancro da mama. Recentemente constatou-se que a BMP heterodimérica 2/7, reduziu a sinalização e invasão destas células cancerígenas, o que poderá ser promissor para um futuro tratamento do cancro (Wu, G., Guo, J. 2012).

## **6. Estudos *in vitro* e *in vivo***

As BMPs 2 e -7 têm sido bastante exploradas em estudos *in vitro* e *in vivo*, como estimulantes das células MSCs na osteogénese. A BMP 2 é imprescindível e apata para esta etapa *in vitro* (Carreira, A.C. et al., 2014). A investigação destas proteínas reside na possibilidade de serem uma alternativa eficaz ao uso de osso autólogo; pelo que foram testadas em reconstrução maxilo-facial, tratamento de defeitos ósseos, fusão espinal e fraturas internas (Giannoudis, P.V., Dimitriou, R. 2005).

Shi, B. et al., (2007), testaram o efeito do uso da BMP 2 na osseointegração. Para a realização deste estudo utilizaram oito coelhos brancos japoneses adultos do sexo masculino, onde colocaram em cada animal um implante embebido em 2ml de água esterilizada e outro em 2ml de água esterilizada com 1,0mg de rhBMP2. Após doze

semanas os animais foram abatidos e observados. Os autores concluíram que o uso rhBMP2 acresceu a qualidade e quantidade de osso formado à volta do implante.

Kobayashi, S. et al., (2009), analisaram *in vivo* de que modo o comportamento de um implante revestido por apatite com incorporação de heparina e BMP 2 pode aumentar a atividade osteoindutiva deste. Os implantes foram colocados na tíbia de ratos, e após três semanas foram analisados. Observaram, que ao redor destes implantes a espessura óssea horizontal e vertical do novo osso formado foi incitada com uso de uma reduzida dose de BMP 2, comparando com o grupo de controlo. A heparina retarda a libertação da BMP 2 e impede a sua degradação decorrente da ligação ao *noggin* (inibidor das BMPs), ou seja, aumenta a semi-vida da BMP 2. Assim, o uso de heparina apresenta-se vantajosa na área da implantologia.

Maki, A.J. et al., (2011), estudaram de que forma a presença de microporosidades (<20µm) e BMP 2 numa *scaffold* bifásica de fosfato de cálcio influencia a quantidade de osso formado. Para a constatação deste facto, usaram um programa de segmentação automática em 3D para a avaliação de grandes conjuntos de dados (novecentas imagens por amostra), personalizado pelos mesmos. Avaliaram a distribuição óssea radial, fração de volume ósseo e a superfície desta na terceira, sexta, décima segunda e vigésima quarta semana, em seis porcos, para cada uma da semana indicada; onde três porcos a cada momento da avaliação possuíam a *scaffolds* com BMP e os outros três não. Os resultados obtidos por estes autores relativamente ao uso de microporosidades com BMP 2 foram positivos. Estes dois componentes contribuíram para a regeneração óssea de maneiras diferentes, mas pensa-se que complementares. A BMP 2 exerceu ação sobre a disposição do osso e áreas específicas de superfície óssea, enquanto as microporosidades, otimizaram a distribuição do osso dentro da estrutura, tornando-a mais uniforme e elevou a fração de volume ósseo. A cicatrização foi duas vezes mais rápida nos grupos onde se administrou BMP e microporosidades do que no grupo sem microporosidades, e quatro

vezes mais quando comparada com os grupos sem BMP. A conjugação destes dois elementos na *scaffold* tornaram mais rápida a regeneração.

Kim, C-S. et al., (2010), exploraram a capacidade de indução da formação óssea em grandes defeitos ósseos na calota craniana e bolsas subcutâneas em ratos, utilizando várias doses (grupo 3: 2.5 mg ErhBMP2/ACS; grupo 4: 5 mg ErhBMP2/ACS; grupo 5: 10 mg ErhBMP2/ACS e grupo 6: 20 mg ErhBMP2/ACS) de rhBMP2 produzida a partir da bactéria *Escherichia coli* (ErhBMP2) carregada numa *absorbable collagen sponge* (ACS). Após duas e oito semanas, a análise histométrica e histológica dos cento e trinta animais, revelou uma maior formação de novo osso em ambos os locais implantados nos ratos, em relação aos grupos de controlo (grupo 1: cirurgia sem incorporação de nenhum sistema osteoindutivo; grupo 2: utilização de ACS sem ErhBMP2). No defeito craniano, todos os grupos tratados com ErhBMP2 demonstraram uma proeminente ligação óssea entre as margens do defeito, assim como um osso mais maturo. Após oito semanas, as margens entre o defeito e o novo osso formado era quase impercetível, o defeito encontrava-se totalmente preenchido (80% a 100%); enquanto nos grupos de controlo apenas 10% a 20% da lesão se encontrava encerrada. Nas bolsas subcutâneas, independentemente das doses, os quatro grupos tratados com ErhBMP2 exibiram formação de novo osso. Em ambos os casos não houve ocorrência de reações adversas tecidulares no uso de ErhBMP2. Comparando o desempenho da ErhBMP2 com rhBMP2, esta só foi uma ordem de magnitude inferior, podendo constituir uma alternativa futura à produção de BMPs recombinantes derivadas de CHO, isto permitiria uma produção em grande escala e de custo reduzido.

Em 2012, Küffer, A. et al., efetuaram uma comparação entre seis sistemas de libertação da BMP 2 e o seu desempenho na osseointegração no maxilar de dezoito porcos pequenos, onde implantaram em cada quadrante superior no local dos pré-molares, três implantes revestidos com fosfato de cálcio, onde uns possuíam BMP 2 incorporada e outros não. É

importante referir a necessidade da utilização de um sistema que liberte gradualmente estes fatores de crescimento através de um reservatório tridimensional e não um sistema bidimensional de rápida libertação. Os implantes revestidos com fosfato de cálcio podem servir como reservatório tridimensional para o uso de BMP 2. Os implantes foram resgatados na primeira, segunda e terceira semana. Realizou-se a respetiva análise morfogénica e verificou-se em cada uma destas avaliações que o volume de osso formado foi maior à volta do implante de revestimento incorporado com um depósito de BMP 2, assim como o pico da atividade osteogénica durante a primeira semana, mantendo-se ao longo do tempo. Concluíram que este sistema osteocondutivo acelerou a conexão entre o osso e implante, sendo mais eficaz do que o implante revestido com BMP 2 incorporada e o revestido com BMP 2 absorvível; pelo que é essencial escolher o sistema mais adequado para o uso das BMPs, uma vez que este influencia a sua capacidade indutora e resposta osteogénica obtida.

Como já foi referido, podem ser incorporados nas *scaffolds* fatores de crescimento, intensificando-se a osteogénese. Liu, C. et al., (2013) sintetizaram através da colocação de pontes de dissulfeto numa *scaffold* biodegradável baseada em *Polyethylene glycol* (PEG) e avaliaram-na como veículo de incorporação para rhBMP2, no tratamento de defeitos críticos no rádio de coelhos e na formação de osso ectópico em bolsas de músculo de membros posteriores de ratos. Como previsto, o uso rhBMP2 proporcionou atividade osteogénica e formação óssea a esta *scaffold* após duas semanas de implantação e aumentou o volume ósseo ao longo do tempo, tanto na *scaffold* degradável como na não degradável. No entanto, as degradáveis parecem ser mais benéficas; possuem capacidade de absorção de fluidos bastantes nutritivos e numa fase inicial permitiram grande infiltração celular, mantendo-se o espaço necessário para posterior migração, agregamento e diferenciação de células, permitindo assim a angiogénese e formação de osso através de hematócitos e osteócitos. Em suma, comparando a *scaffold* tridimensional degradável baseada em PEG com rhBMP2 incorporado, com os grupos de controlo (A:

auto regeneração, B: *scaffolds* puras, C: *scaffolds* com rhBMP2), esta parece ser uma mais-valia na terapêutica regenerativa de grandes defeitos ósseos, uma vez que a regeneração é aprimorada pela presença de rhBMP2 e as propriedades desta *scaffold* proporcionam uma maior adesão celular, encurtando o tempo de angiogênese e regeneração óssea.

Huang, B.J. et al., (2013), desenvolveram um biomaterial híbrido que mimetiza o ambiente extracelular, usando a convencional membrana de colagénio juntamente com uma rede de nanofibras supramoleculares (peptídeos anfifílicos de ligação à heparina e heparina de sulfato). Em defeitos ósseos em ratos, verificaram que este sistema associado a 1 µg de BMP 2 aumentou a retenção *in vitro* da BMP utilizada e estimulou a regeneração de um grande volume ósseo.

Num estudo em várias linhagens celulares e músculo de rato, Maruyama, H. et al., (2009), construíram um vector de BMPs heterodiméricas ambas com a mesma expressão genética, BMP 2/7, onde a sua performance foi comparada com BMP 2 e -7 sozinhas. Radiograficamente, verificaram áreas mais opacas e proeminentes nos músculos onde se utilizou o duplo vector; a osteogénese foi induzida eficazmente. De encontro com estudos anteriores, concluíram que o uso combinado destas BMPs poderá ser benéfico na regeneração óssea e noutras áreas.

A osteoporose é uma doença crónica que afeta uma grande parte da população mundial. É caracterizada pela diminuição da massa óssea, o que poderá levar à ocorrência de fraturas. No sentido de elaborar um tratamento eficaz para esta patologia, Shi, B. et al., (2012), sintetizaram uma nova estrutura de baixo custo, constituída por vidro mesoporoso/fibrina de seda, juntamente com adenovírus de *platelet-derived growth factor-B* (PDGF-b) que possui a habilidade de recrutar células MSCs e BMP 7 com o objetivo de estimular a diferenciação destas células em osteoblastos, onde posteriormente

foi colocada em defeitos osteoporóticos no fêmur de ratos. Foram feitas avaliações na segunda e quarta semana. Identificou-se uma significativa ocorrência de regeneração óssea em relação à impregnação da estrutura sintetizada sozinha e desta com BMP 7. Este sistema revelou-se eficaz, permitindo uma libertação gradual e consistente dos fatores de crescimento ao longo do tempo, não se observando sinais de inflamação ou necrose em todos os animais utilizados neste estudo.

Park, D.S. et al., (2012), desenvolveram uma sequência peptídica com atividade osteogénica através de uma região imatura da BMP 7, denominado *Bone forming peptide-1* (BFP-1). Esta sequência foi comparada *in vivo* e *in vitro* com a BMP 7 em *multipotent bone marrow stromal stem cells* (MBSCs) para possível uso clínico no tratamento de osteoporose. Observou-se que o BFP-1 incrementou a atividade do cálcio e ALP, assim como a expressão do Runx2. Ao fim de oito semanas, o BFP-1 ampliou bastante a formação de novo osso em relação à BMP 7. Este estudo sugere que esta sequência peptídica poderá ser favorável na estimulação de osteogénese e regeneração óssea em diversas áreas, nomeadamente, Medicina Dentária.

A aplicação direta de BMPs não constitui uma ação produtiva, devido ao seu rápido desaparecimento no organismo, pelo que a sua associação a estruturas aptas para a conservação das suas propriedades é um parâmetro muito importante. O desenvolvimento de membranas com bioatividade e porosidade apropriadas é imprescindível para obter bons resultados na formação óssea guiada em áreas como a cirurgia crâniomaxilofacial. Uma membrana adequada favorece a formação de osso compacto no defeito, através do bloqueio da infiltração do tecido mole. Semelhante ao estudo anteriormente referido, Shin, H. et al., (2013), desenvolveram através de uma técnica de *electrospinning*, uma membrana de fibras *electrospun* biodegradáveis baseadas em *Poly lactic-co-glycolic acid* (PLGA) e na superfície desta foi utilizado como sinal osteocondutivo, a imobilização de BFP-1 da região imatura da BMP 7. O uso de pequenas sequências peptídicas das

BMPs parece contornar a instabilidade destas proteínas. Foi testado durante oito semanas *in vitro* de que forma esta membrana promove a diferenciação osteogénica de células tronco mesenquimais humanas, e *in vivo* a regeneração óssea em ratos com defeitos na abóbada craniana. Os resultados foram promissores. *In vitro* as fibras *electrospun* induziram diferenciação osteogénica, e *in vivo* a regeneração óssea foi estimulada, com acréscimo de outras características positivas: grande compatibilidade com o tecido hospedeiro (não apresentaram citotoxicidade), fixação de fibras e reduzida permeabilidade celular.

## 7. Limitações

Já decorreram cerca de cinquenta anos desde a descoberta das BMPs, contudo, a sua aplicação clínica ainda é muito restringida, havendo muito que estudar e esclarecer relativamente a estas proteínas (Nohe, A. et al., 2011; Kokabu, S. et al., 2012).

Apesar das BMPs atuarem em doses muito baixas (na ordem dos ng ou lg), devido à sua curta semi-vida são necessários miligramas no local cirúrgico, de maneira que estas exerçam as suas atividades osteoindutivas, como é caso da BMP 2 (necessita de 2,1mg a 12mg). Isto implica a necessidade de um sistema bastante eficiente que possibilite a produção destas proteínas em elevada quantidade e qualidade (Carreira, A.C. et al., 2014; Lee, B.S. et al., 2014).

É oportuno destacar a importância da obtenção de uma concentração adequada de BMP 2 para o sistema de libertação a ser utilizado, pois esta BMP exerce diferentes efeitos consoante a sua concentração. Na natureza, em doses baixas, promove a formação óssea através da estimulação das células osteoprogenitoras para este efeito. Em doses elevadas promove a reabsorção óssea, exercendo efeito nos osteoclastos (Küffer, A. et al., 2012). Na presença de doses elevadas de BMPs, foram ainda reportados casos de formação óssea excessiva (Giannoudis, P.V., Dimitriou, R. 2005).

Estas proteínas são aplicadas numa fase inicial da regeneração da lesão, onde é característico o processo inflamatório. Este quando acentuado pode inativar uma parte das BMPs, pelo que é importante possuir-se um sistema que proteja e controle a sua libertação, de maneira a que estas sejam apenas disponíveis numa fase mais tardia (fase reparadora) e ainda evitar efeitos adversos devido à elevada libertação inicial (Carreira, A.C. et al., 2014). Esta associação foi verificada numa investigação em roedores, procedida por Zou, G.M. et al., (2014), verificando-se *in vitro* o bloqueio da diferenciação das células mesenquimais em osteoblastos por parte da BMP 2, assim como um declínio na formação óssea por parte da associação BMP 2/ACS.

Para que ocorra osteoregeneração, é necessário a conjugação de uma estrutura (*scaffold*) que permita assegurar a formação do novo osso e uma matriz que guie e estabilize localmente as BMPs, assegurando uma libertação adequada (Deschaseaux, F., Garbuio, P., Obert, L. 2005).

As BMPs tem sido conjugadas com múltiplos sistemas de libertação, como: colagénio, hidroxiapatite, fosfato de tricálcio, entre outros (Giannoudis, P.V., Dimitriou, R. 2005). O suporte de colagénio que tem sido utilizado para libertação das BMPs não possui afinidade para estas, fazendo com que 30% seja libertado inicialmente na sua implantação, o que pode originar hematomas nos tecidos moles, resposta imunitária exagerada que poderá levar à ocorrência de infeções devido à quantidade de anticorpos anti-BMP 2 presentes (Huang, B.J. et al., 2013), convocação de células inflamatórias (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 e TNF- $\alpha$ ), reabsorção óssea e limitada osteoindutividade; estes fatores a longo prazo conduzem ao fracasso clínico da aplicação destas proteínas (Zou, G.M. et al., 2014).

Para além dos sistemas de libertação, várias estruturas (materiais reabsorvíveis como polímeros e cimento de fosfato de cálcio, hidrogéis, produtos de colagénio e até mesmo

combinações entre estes) têm sido usadas para integração destes componentes juntamente com as BMPs (Giannoudis, P.V., Dimitriou, R. 2005).

Um meio adequado para a utilização das BMPs permite a sua mobilização numa área específica, aumentando a sua eficácia (Togashi, A.Y. et al., 2007). Vários biomateriais têm sido testados, a adição de heparina aos sistemas de libertação parece ser benéfica, uma vez que possui grande afinidade para bastantes fatores de crescimento, regulando a sua libertação. Assim, é possível ultrapassar os problemas comuns existentes entre os vários sistemas, como, a rápida e descontrolada libertação da BMP e em elevadas doses inicialmente (Lee, B.S. et al., 2014). Outra vantagem que deve ser indicada, é o fato da utilização conjunta da BMP 2 e heparina induzir maior quantidade de osso mineralizado *in vivo*, quando comparada com administração da BMP 2 isolada (Kobayashi, S. et al., 2009).

As limitações do uso clínico das BMPs na área da Medicina Dentária passam pela imprescindibilidade de elevadas doses para ser eficaz em humanos (contrariamente aos roedores que serviram de modelo para a maior parte dos estudos procedidos até à data), elevado custo, diminuição da resposta devido à idade do paciente, libertação rápida, eventualidade da ocorrência de efeitos colaterais indesejados (resposta imunitária e crescimento ósseo em demasia devido à sua elevada difusão inicial em elevadas quantidades) (Kobayashi, S. et al., 2009; Bandyopadhyay, A., Prashar, P., Yadav, P.S. 2013; Carreira, A.C et al., 2014; Lee, B.S. et al., 2014).

### III. Conclusão

O osso é um tecido que está em constante processo de remodelação, no qual intervêm osteoclastos e osteoblastos. Dentro da matriz óssea, encontram-se fatores de crescimento, tais como as BMPs, que possuem um elevado poder osteoindutivo e osteocondutivo. A sua descoberta foi feita pelo Dr. Urist, o que permitiu um melhor entendimento acerca da fisiologia do osso.

As BMPs são potentes fatores de crescimento, encontram-se envolvidos no processo de embriogénese, neurogénese e hematopoese. *In vitro* e *in vivo* induzem a diferenciação osteoblástica, formação de osso ectópico e regeneração óssea. Anomalias ou deleções dos seus genes podem ainda encontrar-se na origem de algumas patologias e até mesmo serem mortais, dependendo da BMP em questão. Sendo as suas funções inúmeras, a compreensão correta dos mecanismos envolventes destas proteínas, poderá levar mais tarde a novas aplicações terapêuticas.

Vários estudos em modelos animais e ensaios pré-clínicos têm demonstrado que as BMPs aceleram e contribuem para a regeneração óssea, nomeadamente em fraturas. Nos estudos em animais, o efeito da BMP utilizada é dependente da dose, suporte (*carrier*) e animal utilizado. Ainda assim, constatou-se eficácia e segurança no seu uso.

O uso destas proteínas é uma alternativa apelativa ao uso dos materiais autógrafos. No entanto, apesar do seu elevado potencial, o seu uso é bastante restrito. Aplicação clínica da BMP 2 e BMP 7 iniciou-se com aprovação para o tratamento de fraturas e fusão espinal, por parte da FDA. Apresentando possibilidade de administração em Ortopedia e Medicina Dentária. Desde então notou-se um esforço crescente em alargar os seus limites aplicacionais.

Existem várias vias de sinalização que podem regular estas proteínas, a via Smad parece ser a via mais comumente envolvida na formação de novo osso. Fatores antagonistas e potenciadores, condicionam ou estimulam a sua ação. Sendo que todos estes intervenientes são importantes para assegurar o correto funcionamento das BMPs.

Compreender melhor o mecanismo de funcionamento destas proteínas, assim como o desenvolvimento de novos *carriers* que assegurem e conservem as propriedades das BMPs é essencial para assegurar um desenvolvimento e uma revolução no uso destas, assegurando um grande passo na Medicina Regenerativa; especialmente em Medicina e Medicina Dentária.

São necessários mais estudos clínicos randomizados em larga escala, para perceber claramente as limitações e viabilidade da aplicação destes fatores de crescimento em diversas situações clínicas. No entanto o desenvolvimento na área científica, nomeadamente na Engenharia Tecidual, poderá tornar estas proteínas uma ferramenta promissora no tratamento de várias patologias ósseas e não só.

#### IV. Bibliografia

Bandyopadhyay, A., Prashar, P., Yadav, P.S. (2013). BMP signaling in development and diseases: A pharmacological perspective, *Biochemical Pharmacology*, 85, pp. 857-864.

Bandyopadhyay, A. et al., (2014). Microarray meta-analysis identifies evolutionarily conserved BMP signaling targets in developing long bones, *Developmental Biology*, 389, pp. 192-207.

Biase, P.D., Capanna, R. (2005). Clinical applications of BMPs, *International Journal of the Care of the Injured*, 36S, pp. S43-S46.

Boundless. [Em linha]. Disponível em <<https://www.boundless.com/biology/textbooks/boundless-biology-textbook/cell-communication-9/signaling-molecules-and-cellular-receptors-83/forms-of-signaling-380-11606/>>. [Consultado em 02/06/2015].

Carreira, A.C. et al., (2014). Bone Morphogenetic Proteins: Structure, biological function and therapeutic applications, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 561, pp. 64-73.

Casal, M., Bessa, P.C., Reis, R.L. (2008). Bone morphogenetic proteins in tissue engineering: the road from the laboratory to the clinic, part I (basic concepts), *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 2, pp. 1-13.

Chen, Y-G., Li, Z. (2013). Functions of BMP signaling in embryonic stem cell fate determination, *Experimental Cell Research*, 319, pp. 113-119.

Deschaseaux, F., Obert, L., Garbuio, P. (2005). Critical analysis and efficacy of BMPs in long bones non-union, *International Journal of the Care of the Injured*, 36S, pp. S38-S42.

Dinopoulos, H., Giannoudis, P.V. (2007). (iv) The use of bone morphogenetic proteins (BMPs) in long-bone non-unions, *Current Orthopaedics*, 21, pp. 268-279.

Faggetti, A. et al., (2013). Clinical applications of growth factors in bone injuries: Experience with BMPs, *International Journal of the Care of the Injured*, 44, pp. S32-S39.

Fuerst, G., Gruber, R. (2004). Chapter 7: Experimental Approaches in Bone Regeneration. In: Watzek, G. (Ed.). *Implants in Qualitatively Compromised Bone*, Reino Unido, Quintessence Publishing Co, Ltd; pp. 95-112.

Giannoudis, P.V., Dimitriou, R. (2005). Discovery and development of BMPs, *International Journal of the Care of the Injured*, 36S, pp. S28-S33.

Giannoudis, P.V. (2009). Fracture healing of bone regeneration: Autologous bone grafting or BMPs?, *International Journal of the Care of the Injured*, 40, pp. 1243-1244.

Granjeiro, J.M. et al., (2005). Bone morphogenetic proteins: from structure to clinical use, *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 38, pp. 1463-1473.

Gruber, R. (2004). Chapter 2: Mechanisms of Bone Development, Remodeling, and Loss. In: Watzek, G. (Ed.). *Implants in Qualitatively Compromised Bone*, Reino Unido, Quintessence Publishing Co, Ltd; pp. 9-28.

Gurnell, M., Ralston, S.H., Chattrjee, K. (2013). Bone structure and metabolism, *Calcium and Bone*, 41(10), pp. 581-585.

Hill, C.S., Ramel, M.C. (2012). Spatial regulation of BMP activity, *Federation of European Biochemical Societies Letters*, 586, pp. 1929-1941.

Huang, B.J. et al., (2013). Bone regeneration with low dose BMP-2 amplified by biomimetic supramolecular nanofibers within collagen scaffolds, *Biomaterials*, 34, pp. 452-459.

Junqueira, C.L., Carneiro, J. (2008). *Histologia Básica* (11<sup>o</sup>). Rio de Janeiro, Guanabara Koogan S.A., pp. 135-152.

Kim, C-S. et al., (2010). The induction of bone formation in rat calvarial defects and subcutaneous tissues by recombinant human BMP-2, produced in *Escherichia coli*, *Biomaterials*, 31, pp. 3512-3519.

Kobayashi, S. et al., (2009). Bone formation on apatite-coated titanium with incorporated BMP-2/heparin in vivo; *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, 108(6), pp. 867-875.

Kokabu, S. et al., (2012). Role of Smad phosphatases in BMP/Smad signaling axis-induced osteoblast differentiation, *Journal of Oral Biosciences*, 54, pp. 73-78.

Küffer, A. et al., (2012). Osseointegration: The slow delivery of BMP-2 enhances osteoinductivity, *Bone*, 51, pp. 98-106.

Lee, B.S. et al., (2014). Osteogenesis induction of periodontal ligament cells onto bone morphogenic protein-2 immobilized PCL fibers, *Carbohydrate Polymers*, 99, pp. 700-709.

Levi, B. et al., (2015). BMP signaling mediated by constitutively active Activin type 1 receptor (ACVR1) results in ectopic bone formation localized to distal extremity joints, *Developmental Biology*, 400, pp. 202-209.

Li, D. et al., (2012). Smad 1/5 Is Involved in Bone Morphogenetic Protein-2-induced Odontoblastic Differentiation in Human Dental Pulp Cells, *Journal of Endodontics*, 38(1), pp. 66-71.

Liu, C. et al., (2013). Bone regeneration using cell-mediated responsive degradable PEG-based scaffolds incorporating with rhBMP-2, *Biomaterials*, 34, pp. 1514-1528.

Maki, A.J. et al., (2011). Analysis of the roles of microporosity and BMP-2 on multiple measures of bone regeneration and healing in calcium phosphate scaffolds, *Acta Biomaterialia*, 7, pp. 1760-1771.

Maruyama, H. et al., (2009). Simple strategy for bone regeneration with a BMP-2/7 gene expression cassette vector, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 390, pp. 1012-1017.

Miyamoto, A. et al., (2014). Bone morphogenetic protein-induced heterotopic bone formation: What have we learned from the history of a half century?, *Japanese Dental Science Review*, 51(2), pp. 42-50.

Nohe, A. et al., (2011). Bone Morphogenetic Proteins: A critical review, *Cellular Signalling*, 23, pp. 609-620.

Otsuka, F. et al., (2007). TNF- $\alpha$  inhibits BMP-induced osteoblast differentiation through activating SAPK/JNK signaling, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 356(4), pp. 1004-1010.

Otsuka, F. et al., (2012). Bone morphogenetic protein-3b (BMP-3b) inhibits osteoblast differentiation via Smad2/3 pathway by counteracting Smad1/5/8 signaling, *Molecular and Cellular Endocrinology*, 350, pp. 78-86.

Park, D.S. et al., (2012). Osteogenesis induced by a bone forming peptide from the prodomain region of BMP-7, *Biomaterials*, 33, pp. 7057-7063.

Richard, A.B. (2009). Marshall R. Urist, 1914–2001, *Clinical Orthopedics and Related Research*, 467(12), pp. 3049-3050.

Santos, A.A. et al., (2005). O papel da proteína morfogenética óssea na reparação do tecido ósseo, *Acta Ortopédica Brasileira*, 13(4), pp. 194-195.

Schenk, R.K. (1994). Chapter 3: Bone Regeneration: Biologic Basis. In: Dahlin, C.; Buser, D.; Schenk, R.K. (Ed.). *Guided Bone Regeneration in Implant Dentistry*, Hong Kong, Quintessence Publishing Co, Inc; pp. 49-100.

Shi, B. et al., (2007). The influence of recombinant human BMP-2 on bone-implant osseointegration: biomechanical testing and histomorphometric analysis, *International Journal of Oral & Maxillofacial Surgery*, 36, pp. 345-349.

Shi, B. et al., (2012). Delivery of PDGF-B and BMP-7 by mesoporous bioglass/silk fibrin scaffolds for the repair of osteoporotic defects, *Biomaterials*, 33(28), pp. 6698-6708.

Shimidmaier, G., Calori, G.M., Blokhuis, T.J. (2013). Autograft versus BMPs for the treatment of non-unions: What is the evidence?, *International Journal of the Care of the Injured*, 44(S1), pp. S40-S42.

Shin, H. et al., (2013). Electrospun fibers immobilized with bone forming peptide-1 derived from BMP7 for guided bone regeneration, *Biomaterials*, 34, pp. 5059-5069.

Simeoni, I., Gurdon, J.B. (2007). Interpretation of BMP signaling in early *Xenopus* development, *Developmental Biology*, 308(1), pp. 82-92.

Togashi, A.Y. et al., (2007). Uso da BMP-2 e 7 na promoção da osseointegração às superfícies dos implantes de titânio, *Revista do Instituto de Ciências da Saúde*, 25(4), pp. 443-448.

Tomoyasu, A. et al., (2006). Purification and identification of a BMP-like factor from bovine serum, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 345, pp. 1224-1231.

Ventura, F. et al., (2002). Inhibition of PI3K/p70 S6K and p38 MAPK cascades increases osteoblastica differentiation induced by BMP-2, *Federation of European Biochemical Societies Letters*, 510, pp. 99-104.

Verheyen, E.M. (2007). Opposing effects of Wnt and MAPK on BMP/Smad signal duration, *Development Cell*, 13(6), pp. 755-756.

Watzek, G. (2004). Chapter 1: Overview of Factors Affecting Bone Quality. *In: Watzek, G. (Ed.). Implants in Qualitatively Compromised Bone*, Reino Unido, Quintessence Publishing Co, Ltd; pp. 1-8.

Wozney, J.M. (2002). Overview of Bone Morphogenetic Proteins, *The Spine Journal*, 27(16S), pp. S2-S8.

Wu, G., Guo, J. (2012). The signaling and functions of heterodimeric bone morphogenetic proteins, *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 23, pp. 61-67.

Zhang, J., Li, L. (2005). BMP signaling and stem cell regulation, *Developmental Biology*, 284, pp. 1-11.

Zou, G.M. et al., (2014). Opposing TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$ - and BMP-2-activated MAPK signaling pathways converge on Runx2 to regulate BMP-2-induced osteoblastic differentiation, *Cell Death and Disease*, 5, pp. 1-11.