

PROTEÍNAS DENTINOGÉNICAS: O MATERIAL IDEAL PARA PULPOTOMIAS

Maria Esmeralda A. G. Ribeiro da Costa - Faculdade de Ciências da Saúde, UFP
Aluna de Medicina Dentária | 7707@ufp.pt

■ ABSTRACT

The pulpotomy technique consists in the extirpation of the coronary pulp and in the placement, in the entrance of the root canals, of a material that protects and preserves the vitality of the remaining pulp in the root. With that purpose, many pulp capping materials have been proposed, as the formocresol, glutaraldehyde, calcium hydroxide and more recently, the morphogenetic proteins. The aim of this work was the study of the action and use of those proteins, capable to induce the dentin formation, while capping agents of pulpar stumps in the pulpotomy.

■ RESUMO

A técnica de pulpotomia consiste na extirpação da polpa coronária e na colocação, na entrada dos canais, de um material que proteja e preserve a vitalidade da polpa radicular remanescente. Com essa finalidade, muitos materiais de recobrimento pulpar têm sido propostos, como o formocresol, glutaraldeído, hidróxido de cálcio e, mais recentemente, as proteínas dentinogénicas. O objectivo deste trabalho foi o estudo da acção e utilização dessas proteínas, capazes de induzir a formação de dentina, enquanto agentes de recobrimento de cotos pulpares na pulpotomia.

I. INTRODUÇÃO

A pulpotomia é um procedimento clínico relativamente comum na prática Odontopediátrica. É o tratamento de escolha para dentes decíduos vitais que apresentam lesão cáriosa extensa e profunda, com tecido pulpar exposto ou cuja exposição ocorre no momento da remoção do tecido cariado.

A técnica da pulpotomia tem por objectivo manter a polpa radicular vital, em condições de saúde e de regeneração para que o ciclo biológico do dente decíduo seja concluído naturalmente. Para isso, muitos materiais com diferentes composições têm sido sugeridos.

O uso do **formocresol** foi preconizado por Buckley³, em 1904. Desde então, é o mais utilizado nas pulpotomias de dentes decíduos. No entanto, embora esteja comprovado o sucesso clínico obtido com a utilização deste material na pulpotomia de dentes decíduos, muitos estudos apontam reacções adversas ao formaldeído, não apenas para a polpa, mas também para os tecidos periapicais e folículo dentário do dente sucessor. Na tentativa de superar esta situação, alguns estudos foram feitos com o uso do formocresol diluído de sua fórmula original. Porém, alguns autores questionam os benefícios desta diluição, e dúvidas permanecem quanto à toxicidade, mutagenicidade e carcinogenicidade do formaldeído, que não deveriam ser desconsideradas.

172 Outros medicamentos como o **glutaraldeído** e o **sulfato férrico** têm sido avaliados como alternativas para a técnica da pulpotomia, mas nenhum tem mostrado tão boa performance quanto o formocresol.

O tratamento por meio da pulpotomia, deveria manter a polpa radicular vital e saudável, mas também completamente isolada da câmara pulpar por uma camada de dentina e odontoblastos. Para tal, seria necessário utilizar medicamentos que promovessem a regeneração pulpar e estimulassem a formação de dentina. Estes materiais são o **hidróxido de cálcio**, o **Agregado de Trióxido Mineral** e mais recentemente, as **proteínas dentinogénicas**.

O Agregado de Trióxido Mineral (ou MTA) e o hidróxido de cálcio estimulam a formação de tecido duro pela deposição de granulações de calcita. Em 1996, Abedi¹ e colaboradores avaliaram as pulpotomias realizadas com MTA e hidróxido de cálcio em dentes de cães e evidenciaram a formação de uma ponte calcificada maior e menor inflamação no grupo com MTA em comparação com o grupo do hidróxido de cálcio. A reabsorção interna foi eleita como o principal sinal de insucesso das pulpotomias com hidróxido de cálcio em dentes decíduos.

Recentemente, avanços no campo da biotecnologia abriram novos horizontes para a terapia pulpar, por meio da indução de dentina reparadora, com o uso de proteínas dentinogénicas similares às nativas do organismo. Desde então, com o intuito de originar um agente de recobrimento **verdadeiramente biológico**, várias destas proteínas têm sido clonadas, e as suas actividades celulares caracterizadas tanto *in vitro* como *in vivo*.

Este trabalho tem como objectivo realizar um estudo sobre a acção e utilização dessas proteínas, capazes de induzir a formação de dentina, enquanto agentes de recobrimento de cotos pulpares na técnica de pulpotomia.

II. A DESCOBERTA, A ACÇÃO E A FUNÇÃO DAS PROTEÍNAS DENTINOGÉNICAS

Na tentativa de tratar lesões ósseas perenes, Marshal Urist¹⁵ em 1965, fez uma descoberta pioneira. O autor implantou amostras de ossos animal e humano, removidas em condições assépticas e descalcificadas em solução de ácido clorídrico, em tecido muscular de animais de laboratório. Após quatro semanas, observou os primeiros depósitos ósseos. A neoformação nos implantes de matriz óssea descalcificada ocorreu por meio da proliferação celular do hospedeiro, concluindo-se que a matriz óssea contém um factor capaz de auto-indução. Esse factor foi denominado de **proteína óssea morfogenética** (bone morphogenetic protein – BMP).

A designação BMP, implica um único produto genético, responsável apenas pela formação de osso. No entanto, a BMP está relacionada com produtos genéticos **multifuncionais**, expressos pelo desenvolvimento embriológico. Existe, assim, uma família de proteínas que apresenta esta **propriedade indutora** e que é denominada por este termo genérico. Todas provocam a

formação de **osso** ou **dentina** (proteínas dentinogénicas), dependendo apenas do **local onde são implantadas**, mas cada uma, provavelmente, apresenta uma função específica durante a embriogénese (Nakashima, 1990; Rutherford, 1993; Nakashima, 1994).

As proteínas com maior capacidade de estimular a formação de dentina reparadora, são: a BMP-2, BMP-4, e BMP-7. As BMPs estimulam a actividade da **fosfatase alcalina**, que é uma enzima hidrolítica que promove a libertação de fosfato inorgânico a partir de ésteres fosfóricos. Os iões fosfato libertados reagem com os iões cálcio, na forma de hidroxiapatite, sobre a matriz orgânica, caracterizando assim o processo de mineralização. Outros estudos, indicam que a BMP induz a expressão de **osteocalcina**, um marcador específico para a diferenciação de odontoblastos, assim como também pode favorecer a formação de dentina, estimulando a diferenciação de células pulpares em odontoblastos, através da activação da síntese desta glicoproteína.

As BMPs não são apenas um factor de indução de calcificação ectópica; apresentam também grande participação na **diferenciação de muitos órgãos e tecidos**. Sem as BMPs, os animais experimentais nascem com problemas de formação do coração, pulmões e fígado, e parecem ainda estar implicadas na patologia da osteoporose.

As funções das BMPs podem ser genericamente resumidas da seguinte forma:

- BMP-2 Osteoindutiva, apoptose, diferenciação de osteoblastos;
- BMP-3 (osteogenina) Inibe osteogénese;
- BMP-4 Osteoindutiva, desenvolvimento do pulmão e sistema ocular;
- BMP-5 Condrogénese;
- BMP-6 Condrogénese, diferenciação de osteoblastos;
- BMP-7 Osteoindutiva, desenvolvimento do fígado;
- BMP-8 Osteoindutiva;
- BMP-9 Hepatogénese, Sistema nervoso;
- BMP-10 Desenvolvimento cardíaco
- BMP-11 Morfogénese do sistema nervoso, órgãos de origem mesodérmica;
- BMP-12 Desenvolvimento de tendões e ilíacos;
- BMP-13 Desenvolvimento de tendões e ligamentos;
- BMP-14 Condrogénese;
- BMP-15 Modifica actividade da hormona folículo estimulante.

III. A PRODUÇÃO INDUSTRIAL DAS PROTEÍNAS ÓSSEAS MORFOGENÉTICAS (BMPS)

O conjunto de proteínas BMP pode ser extraído de tecido ósseo maduro. Após a remoção de gordura, células e fibras obtém-se um sobrenadante, o qual é posteriormente filtrado e purificado, usando uma série de procedimentos de cromatografia. O extracto purificado possui componentes das BMPs, formando uma solução de proteínas, que pode, eventualmente, conter elementos inibidores da actividade das BMPs.

174 Embora este método tenha sido utilizado com algum sucesso experimental, não é utilizado para a produção industrial, por não ser possível uma consistência da composição relativa dos diversos componentes.

Outro método utilizado é o da **recombinação**, que consiste na inserção de fragmentos de DNA, responsáveis pela sequência genética das BMPs, dentro do núcleo de bactérias ou células. As BMPs assim produzidas, são denominadas de rhBMPs (“recombinant human bone morfogenetic proteins”). A BMP-2 e a BMP-7, são normalmente produzidas assim, e passam a ser denominadas de rhBMP-2 e rhBMP-7.

As sequências específicas, são introduzidas num vector apropriado que contém potencializadores e marcadores específicos para esta sequência. Este vector, é então transferido para a célula hospedeira, normalmente células CHO (“Chinese Hamster Ovaria”) ou bactéria *Escherichia coli*. Actualmente, a produção de BMPs é feita em bactérias, por uma questão de produtividade. Como a reprodução de *Escherichia Coli* é muito mais rápida que as células CHO, há influência directa no preço final de produção.

A sequência de BMP é então amplificada, até que muitas cópias desta sequência residam num cromossoma destes hospedeiros. Após testes de fidelidade de expressão, esta linhagem é conservada num banco de células. As células são aí fermentadas em tanques e os extractos são purificados a partir do meio de cultura. As moléculas assim obtidas, são dimerizadas, processadas (ou seja, com remoção do propeptídio) e glicosiladas.

As vantagens deste processo, são a obtenção de moléculas com **actividade homogénea, livre de contaminações** e de maneira totalmente **reproduzível**.

Os produtos presentes no mercado internacional, usam apenas proteínas recombinantes, nomeadamente a BMP-2 e BMP-7. Destacam-se, de seguida, os mais importantes:

Bonefill BMP - Produzido pela Kunzel Brasil, é uma matriz de osso bovino inorgânico aglutinado com ácido polilático-poliglicólico e colagénico. Contém rhBMP-2 produzida em *E. coli*. Destina-se ao tratamento de áreas intra-orais e cirúrgicas, prévias à colocação de implantes.

Colagénico BMP - Produzido pela Kunzel Brasil, é uma esponja de colagénico com rhBMP-2 produzida em *E. coli*. Tem aplicações relacionadas com o tratamento periodontal.

Inductos - Produzido pela Wyeth, é um veículo de colagénico com rhBMP-2 a 1.5 mg/ml. É utilizado sobretudo no tratamento de fracturas da tibia.

OP- 1 - Produzido pela Stryker, é um pó de colagénico com rhBMP-7. Destina-se a acelerar o tratamento de fracturas que não seguiram o curso normal de cicatrização.

Infuse - produzido pela Sofamore-Danek, é uma esponja de colagénico que contém rhBMP-2. Utiliza-se para o tratamento da coluna vertebral.

IV. CONTRIBUTO DOS ESTUDOS *IN VIVO* E *IN VITRO*

Em 1990, Nakashima⁷, utilizou as BMPs no tratamento conservador da polpa. Os seus estudos *in vivo*, indicam que estas proteínas podem ter **efeitos mitogénicos** nas células mesenquimais da polpa, além de estimularem a formação de osteodentinócitos. A osteodentina resultante, pode ter um papel na diferenciação dos odontoblastos. *In vitro*, não foram capazes de induzir a proliferação de células mesenquimais da polpa, porém, estimularam a diferenciação de células pulpares em odontoblastos. Existem receptores celulares na polpa, que interagem com sinais específicos das proteínas, induzindo a formação de tecido dentinário.

Bessho² e seus colaboradores em 1991, extraíram e purificaram BMPs de matriz humana de dentes vitais, colectados logo após exodontia. As BMPs foram implantadas em tecido muscular de ratos, e a actividade óssea morfogenética foi detectada histologicamente. Os autores concluíram que a BMP produziu a diferenciação de células mesenquimatosas imaturas em cartilagem, e que a BMP derivada da matriz dentinária é muito similar à BMP derivada da matriz óssea, uma vez que ambas produzem a mesma acção *in vivo*.

O **tempo** necessário para as BMPs promoverem a formação de uma adequada ponte de dentina, é ainda desconhecido. Nakashima⁷, em 1990, recobriu polpas de cães e pode verificar formação de ponte de dentina entre a quarta e oitava semana após o procedimento. Em 1993, Rutherford¹⁰ e seus colaboradores, em estudos efectuados em macacos, observou a formação de ponte de dentina após seis semanas. No mesmo ano, Lianjia, Yuhao e White⁶, puderam observar a formação desta ponte após três semanas. Estudos em animais têm demonstrado a formação de ponte de dentina até **quatro semanas** após aplicação tópica das BMPs, todos com a manutenção da vitalidade e sem provocarem necrose no tecido pulpar.

Da análise comparativa entre as BMPs e o hidróxido de cálcio, concluiu-se que a formação de ponte de dentina resultante das BMPs, foi obtida mais rapidamente. Lianjia, Yuhao e White⁶, em polpas de cães com a mesma quantidade de BMP e hidróxido de cálcio em grupos diferentes, evidenciaram ponte de dentina com utilização das BMPs após três semanas; enquanto que, com hidróxido de cálcio, a ponte ainda não tinha sido observada em quatro semanas.

Nakashima⁸, em 1994, em polpas amputadas de dentes de cães, utilizando BMP em diferentes concentrações, evidenciou a dependência da dose, como factor decisivo na formação da ponte de dentina.

Apesar de ser considerada um agente de recobrimento biológico, a BMP parece induzir um trauma no tecido pulpar nos estágios iniciais. Lianjia⁶ e colaboradores, em 1993, concluíram que, após uma semana, todas as polpas

176 recobertas com BMP apresentavam sinais de inflamação, e diversos fragmentos desta proteína ainda podiam ser observados. Após duas semanas, a BMP havia sido **totalmente reabsorvida**; o tecido pulpar apresentava **ausência de inflamação** e dois tipos de dentina reparadora podiam ser observados: osteodentina (com células ovoides) e dentina regular (com túbulos dentinários). Em 1997, Jenpsen⁵, também evidenciou a presença de infiltrado inflamatório durante o processo de formação de tecido dentinário induzido pela BMP. Na ausência de infecção, a polpa restabelece-se e fica em condições apropriadas para iniciar o processo de reparação.

Outros estudos *in vitro*, têm demonstrado a existência de receptores celulares na polpa. Estes receptores, interagem com **sinais específicos** da BMP, transmitindo-os para que as células reajam a estes sinais, induzindo a formação de tecido dentinário. A formação de uma ponte de dentina, após a realização da pulpotomia, isola o tecido pulpar remanescente dos efeitos tóxicos oriundos dos materiais restauradores.

Jenpsen⁵ e colaboradores, em 1997, observaram grandes quantidades de tecido duro com osteodentina e dentina tubular, com completo selamento dos defeitos. Com hidróxido de cálcio, foi observada menor quantidade de dentina.

Em estudos mais recentes, realizados em 2002, em molares de roedores, Six, Lasfargues e Goldberg¹², afirmaram que a mistura colagêneo - BMP é capaz de preservar a vitalidade pulpar e induzir a formação de dentina reparadora, sendo útil na terapêutica pulpar de dentes vitais. O material não deixa resíduos, é reabsorvido, e completamente substituído pelo tecido formado. Supõe-se então, que as BMPs promovem **um bom selamento** evitando a contaminação através de infiltração marginal da restauração.

V. CONCLUSÃO

A possibilidade de utilizar um factor capaz de induzir a formação óssea, significa um grande avanço nos tratamentos cirúrgicos ortopédicos e periodontais.

Na medicina dentária, as aplicações para a terapêutica pulpar são consideráveis. A Proteína Óssea Morfogenética, é um material com **excelente biocompatibilidade**, induz a formação de uma ponte dentinária sem defeitos, não deixa resíduos e apresenta bons resultados quando utilizada em animais.

Apesar de outros materiais, como o hidróxido de cálcio, terem sido usados em estudos clínicos e laboratoriais, poucos são **tão eficientes** na indução de formação de uma ponte de dentina como a Proteína Óssea Morfogenética. A maioria deles, pode até apresentar efeitos citotóxicos e induzir reabsorções internas.

Além disso, os autores que avaliaram os efeitos das BMPs sobre polpa exposta de dentes de animais, observaram que a formação de dentina ocorreu

logo por baixo da área que recebeu o material. Não foi observada indução de formação de dentina na polpa radicular. Esta propriedade é muito importante, uma vez que uma das preocupações decorrentes da estimulação da formação dentinária, é a possível mineralização da polpa radicular, com conseqüente obliteração dos canais radiculares. Isso pode dificultar, ou mesmo impossibilitar, um futuro tratamento endodôntico radical caso venha a ser necessário.

Para além desta, uma das maiores vantagens que podem ser atribuídas a estas proteínas, é a resposta celular ser **dose-dependente**. Diversas pesquisas, comprovaram que a quantidade em espessura, de dentina formada, variou de acordo com a quantidade de medicamento utilizado. Esta é uma propriedade nunca antes atribuída a um agente de recobrimento pulpar.

Inúmeros autores consideram que as proteínas dentinogénicas apresentam vantagens sobre os outros materiais e que, brevemente, irão substituí-los nos procedimentos de recobrimento pulpar directo e nas pulpotomias. É necessário, porém, um maior conhecimento das suas propriedades biológicas e resultados em experiências humanas.

Pesquisas clínicas em humanos continuam a ser desenvolvidas, embora os seus resultados ainda não tenham sido publicados. Novos estudos que avaliem a resposta do tecido pulpar humano, decorrente da utilização destas proteínas, tanto laboratoriais como clínicos, seguramente, irão fornecer maior informação para a sua utilização clínica.

■ BIBLIOGRAFIA

- 1 Abedi et al.(1996). The use of Mineral Tri-óxide Aggregate Cement (MTA) as a direct pulp capping agent. In: *Journal of Endodontics*, v.22, n.4, april.
- 2 Bessho, K. et al.(1991). Human dentin-matrix-derived bone morphogenetic protein. In: *Journal of Dental Research*, USA, v. 70, n. 3, p. 171-175.
- 3 Buckley, J.P.(1994). The chemistry of pulp decomposition with a rational treatment for this condition and its sequelae. In: *American Dental Journal*, USA, v. 3, p. 764-771.
- 4 Ferreira, L. P.(2001).Pulpotomia: Estudo comparativo entre Glutaraldeído a 4% e formocresol a 20% em dentes decíduos vitais. In: *Excerpta Bibliográfica Dentária*, v.7, n.º1, Jan/Mar.
- 5 Jenpsen, S. et al.(1997). Recombinant Human Osteogenic Protein-1 Induces Dentine Formation: experimental study in miniature swine. In: *Journal of Endodontics*, v.23,nº6,p.378-382.
- 6 Lianjia,Y.; Yuhao,G.; White, F. (1993). Bovine bone morphogenetic protein-induced dentinogenesis. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, n. 295, p.305-312.
- 7 Nakashima, M. (1990). The induction of reparative dentine in the amputated dental pulp of the dog by bone morphogenetic protein. In: *Archives of Oral Biology*, UK, v.35, n. 7, p. 493-497.

- 178 8 Nakashima, M. (1994). Induction of dentin formation on canine amputated pulp by recombinant human bone morphogenetic proteins (BMP)-2 and -4. In: *Journal of Dental Research*, USA, v. 73, n.º9, p. 1515-1522.
- 9 Ranly, D.M. (1994). Pulpotomy therapy in primary teeth: new modalities for old rationales. In: *Pediatric Dentistry*, USA, v. 16, n. 6, p. 403-409.
- 10 Rutherford, R.B. (1993). Induction of reparative dentine formation in monkeys by recombinant human osteogenic protein-1. In: *Archives of Oral Biology*, UK, v.38, n.7, p.571-576.
- 11 Rutherford, R.B. (1997). Osteogenic protein-1 increases bone morphogenetic protein receptor-II mRNA level in human dental pulp fibroblast. In: *Journal of Dental Research*, USA, v. 76, p. 179.
- 12 Six, N.; Lasfargues, J.J.; Goldberg, M. (2002). Differential repair responses in the coronal and radicular areas of the exposed rat molar pulp induced by recombinant bone morphogenetic protein-7. In: *Archives of Oral Biology*, v.47, nº3, p.177-187.
- 13 Shoji, S.; Nakamura, M.; Horiuchi, H. (1985). Histopathological report on laser pulpotomy. In: *Journal of Endodontics*, USA, v.11, p.379-384.
- 14 Sweet, C.A. (1930) Procedure for treatment of exposed and pulpless deciduous teeth. In: *Journal of American Dental Association*, USA, v.17, p.1150-1153.
- 15 Urist, M.R. (1965). Bone: Formation By Autoinduction. In: *Science*, v.150, n.º3689, p.893-899.