

UNIVERSIDADE DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA EM
MEDICINA REGENERATIVA E QUÍMICA MEDICINAL

ANA LUCIA COLANGE



**PRODUÇÃO DA BMP-2 RECOMBINANTE DE HUMANO (rhBMP-2)
PARA FUNCIONALIZAÇÃO DE BIOPOLÍMEROS EM REPARO
ÓSSEO**

Araraquara-SP
2017

ANA LUCIA COLANGE

**PRODUÇÃO DA BMP-2 RECOMBINANTE DE HUMANO (rhBMP-2)
PARA FUNCIONALIZAÇÃO DE BIOPOLÍMEROS EM REPARO
ÓSSEO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal da Universidade de Araraquara como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia. Área de concentração: Medicina Regenerativa.

Orientadora: Profa. Dra. Mônica Rosas da Costa Iemma
Co-Orientador: Prof. Dr. André Capaldo Amaral

Araraquara-SP
2017

C648p Colange, Ana Lucia
Produção da BMP-2 recombinante de humano (rhBMP-2) para
funcionalização de biopolímeros em reparo ósseo/Ana Lucia
Colange. – Araraquara: Universidade de Araraquara, 2017.
52f.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em
Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal –
UNIARA

Orientador: Profa. Dra. Mônica Rosas da Costa Iemma

1. RhBMP-2. 2. Clonagem. 3. Recombinante. 4. Regeneração óssea. 5. Suportes biológicos. I. Título.

CDU 610

ANA LUCIA COLANGE

Dissertação apresentada a Universidade de Araraquara - UNIARA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal.

Araraquara, 03 de julho de 2017.

BANCA EXAMINADORA

Mônica R da Costa Iemma

Prof^a Dr^a MÔNICA ROSAS DA COSTA IEMMA (Orientadora)
Universidade de Araraquara - UNIARA

Flávia Aparecida Resende

Prof^a Dr^a FLÁVIA APARECIDA RESENDE NOGUEIRA
Universidade de Araraquara - UNIARA

Kelli Cristina Micocci

Dr^a KELLI CRISTINA MICOCCI
Universidade Federal de São Carlos - UFSCar

DADOS CURRICULARES

FORMAÇÃO ACADÊMICA

Graduada em Fisioterapia pela Universidade Estadual de Londrina (UEL) - 2008

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

• Artigos completos publicados em periódicos

KOVELIS, DEMETRIA; ZABATIERO, JULIANA; OLDEMBERG, NICOLI; COLANGE, ANA LUCIA; BARZON, DANIELLE; NASCIMENTO, CÍNTIA H.S.C.; PROBST, VANESSA S.; PITTA, FABIO. Responsiveness of Three Instruments to Assess Self-Reported Functional Status in Patients with COPD. COPD. Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease **JCR**, v. 8, p. 334-339, 2011.

Citações: **WEB OF SCIENCE** 5 | **SCOPUS** 6

MOREIRA, G. L.; PITTA F; RAMOS, D.; NASCIMENTO, C. H. S. C.; BARZON, D.; KOVELIS, D.; COLANGE, A. L.; BRUNETTO, A. F.; RAMOS, E. M. C. Portuguese version of the Chronic Respiratory Questionnaire (CRQ): A study of validity and reproducibility. Jornal Brasileiro de Pneumologia (Impresso) **JCR**, v. 35, p. 737-744, 2009.

• Trabalhos publicados em anais de eventos científicos

COLANGE, A. L.; KOVELIS, D.; SEGRETTI, N. O.; NASCIMENTO, C. H. S. C.; BRUNETTO, A. F.; PITTA F. Responsividade de três questionários de atividades de vida diária (AVD) em pacientes com DPOC. In: XVII Encontro Anual de Iniciação Científica (EAIC), 2008, Foz do Iguaçu - PR. Anais do XVII Encontro Anual de Iniciação Científica (EAIC), 2008.

• Resumos publicados em anais de congressos

OLDEMBERG, N.; COLANGE, A. L.; BARZON, D.; NASCIMENTO, C. H. S. C.; PROBST, V. S.; BRUNETTO, A. F.; PITTA F. Responsiveness of 3 subjective instruments for assessment of functional status in patients with COPD. In: XVIII European Respiratory Society Annual Congress, 2008, Berlin - Alemanha. European Respiratory Journal, 2008. v. 32. p. 729s.

OLIVEIRA, N. H.; TAKAKI, M. Y.; MORAES, V. C.; FONTANA, A. D.; SANT'ANNA, T. J. P.; SEGRETTI, N. O.; COLANGE, A. L.; PROBST, V. S.; BRUNETTO, A. F.; PITTA F. Relação entre função pulmonar, dispnéia nas atividades da vida diária e agilidade em pacientes com DPOC. In: XIV Simpósio Internacional de Fisioterapia Respiratória e Fisioterapia em Terapia Intensiva, 2008, Recife - PE. Revista Brasileira de Fisioterapia, 2008. v. 12. p. 18.

GUIMARAES, M. M.; VITORASSO, R.; FONTANA, A. D.; COLANGE, A. L.; BARZON, D.; NASCIMENTO, C. H. S. C.; PROBST, V. S.; BRUNETTO, A. F.; PITTA F. Avaliação objetiva e subjetiva do nível de atividade física na vida diária em pacientes com DPOC. In: XIV Simpósio Internacional de Fisioterapia Respiratória e Fisioterapia em Terapia Intensiva, 2008, Recife - PE. Revista Brasileira de Fisioterapia, 2008. v. 12. p. 16.

KOVELIS, D.; SEGRETTI, N. O.; COLANGE, A. L.; NASCIMENTO, C. H. S. C.; BARZON, D.; PROBST, V. S.; LAREAU, S.; BRUNETTO, A. F.; PITTA F. Validação da versão em português do questionário Pulmonary Functional Status and Dyspnea (PFSDQ-M) e da escala do Medical Research Council (MRC) para pacientes com DPOC. In: XIV Simpósio Internacional de Fisioterapia Respiratória e Fisioterapia em Terapia Intensiva, 2008, Recife - PE. Revista Brasileira de Fisioterapia, 2008. v. 12. p. 23.

CARVALHO, C.; SEGRETTI, N. O.; KOVELIS, D.; COLANGE, A. L.; BARZON, D.; PROBST, V. S.; BRUNETTO, A. F.; PITTA F. Responsividade de três questionários de atividades da vida diária (AVD) em pacientes com DPOC. In: XIV Simpósio Internacional de Fisioterapia Respiratória e Fisioterapia em Terapia Intensiva, 2008, Recife - PE. Revista Brasileira de Fisioterapia, 2008. v. 12. p. 79.

MOREIRA, G. L.; PITTA F.; CARVALHO, C.; BARZON, D.; COLANGE, A. L.; SEGRETTI, N. O.; KOVELIS, D.; BRUNETTO, A. F.; VANDERLEI, L. C. M.; RAMOS, D.; RAMOS, E. M. C. Versão em português do Chronic Respiratory Questionnaire (CRQ): estudo de validação. In: XIV Simpósio Internacional de Fisioterapia Respiratória e Fisioterapia em Terapia Intensiva, 2008, Recife - PE. Revista Brasileira de Fisioterapia, 2008. v. 2008. p. 89.

MORAES, V. C.; OLIVEIRA, N. H.; TAKAKI, M. Y. ; COLANGE, A. L.; CARVALHO, C.; BARZON, D.; OLDEMBERG, N.; PROBST, V. S.; BRUNETTO, A. F. ; PITTA F. Influência do sexo e da gravidade da DPOC na relação entre função pulmonar e AVD. In: XIV Simpósio Internacional de Fisioterapia Respiratória e Fisioterapia em Terapia Intensiva, 2008, Recife - PE. Revista Brasileira de Fisioterapia, 2008. v. 12. p. 98.

CARVALHO, M. J.; SANVEZZO, N. M.; FURLANETTO, K. C.; SEGRETTI, N. O. ; COLANGE, A. L.; PROBST, V. S.; BRUNETTO, A. F.; PITTA F. O aumento da força muscular se correlaciona com a melhora das atividades da vida diária na DPOC? In: IV Congresso Sul-Brasileiro de Fisioterapia Respiratória e Fisioterapia em Terapia Intensiva, 2007, Santa Cruz do Sul. Anais do IV Congresso Sul-Brasileiro de Fisioterapia Respiratória e Fisioterapia em Terapia Intensiva, 2007.

SEGRETTI, N. O.; KOVELIS, D.; COLANGE, A. L.; PROBST, V. S.; BRUNETTO, A. F.; PITTA F. Avaliação da responsividade da escala LCADL após um programa de treinamento em pacientes com DPOC. In: IV Congresso Sul-Brasileiro de Fisioterapia Respiratória e Fisioterapia em Terapia Intensiva, 2007, Santa Cruz do Sul. Anais do IV Congresso Sul-Brasileiro de Fisioterapia Respiratória e Fisioterapia em Terapia Intensiva, 2007.

KOVELIS, D.; SEGRETTI, N. O.; COLANGE, A. L.; PROBST, V. S.; BRUNETTO, A. F.; PITTA F. Validação da versão em português de dois instrumentos para avaliação das AVDs em pacientes com DPOC. In: IV Congresso Sul-Brasileiro de Fisioterapia Respiratória e Fisioterapia em Terapia Intensiva, 2007, Santa Cruz do Sul. Anais do IV Congresso Sul-Brasileiro de Fisioterapia Respiratória e Fisioterapia em Terapia Intensiva, 2007.

PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS CIENTÍFICOS

I Fórum Nacional de Pós-graduações em Biotecnologia, 2016, Rio de Janeiro - RJ.
X Congresso de Iniciação Científica da Uniara, 2015, Araraquara - SP
XVII Encontro Anual de Iniciação Científica (EAIC), 2008, Foz do Iguaçu - PR.
VII Congresso Londrinense de Fisioterapia, 2007, Londrina - PR

*À minha família e amigos pelo apoio incondicional.
A Deus, pela força e discernimento.*

Agradecimentos

A Deus por iluminar-me e dar-me forças em todas as etapas deste trabalho.

À minha mãe Carmem, ao meu pai Hélio e a minha irmã Eliana, pela paciência e amor transmitidos durante todo este processo de aprendizagem pelo qual passei.

À Prof. Dra. Monica Rosas da Costa Iemma, por ter me acolhido em sua pesquisa e ter me orientado através de seus valiosos conhecimentos. Muito obrigada pela paciência, competência e dedicação na condução deste trabalho.

Ao Prof. Dr. André Capaldo Amaral, pela co-orientação e incentivo desde o início desta trajetória.

À Prof. Dra. Heloisa Sobreiro Selistre de Araújo, pela disponibilização do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular do Departamento de Ciências Fisiológicas da UFSCar, onde pude desenvolver parte importante da minha pesquisa.

À Sandra R. Pavanelli, pela figura de “mãe” a qual adotou desde o começo, por sua dedicação e competência na condução da secretaria.

A todos os meus colegas de turma: Ana Lucia, Bonini, Bruna, Dario, Filipe, Guilherme, Jussara, Renata e Silmara que, cada um, da sua forma, sempre me ofereceram ajuda.

A todos os docentes do programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Uniara que, de alguma forma, muito contribuíram para o meu aprendizado.

Às Profs. Dra Eliane Trovatti, Dra Kelly Micocci e Dra Flávia Resende Nogueira, pelas valiosas contribuições para a continuidade deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular do Departamento de Ciências Fisiológicas da UFSCar, pelo apoio e todo auxílio que me deram: Ana Carolina, Angie, Bete, Bruna, Milene, Patty, Rafael, Tainá, Uliane e Vanessa.

À doutoranda Tais Marolato do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular do Departamento de Ciências Fisiológicas da UFSCar, por todo auxílio prestado durante todas as etapas experimentais.

Ao amigo, conselheiro e companheiro de Mestrado, Miguel Saciloto, que esteve tão presente, me auxiliando muito em fase conclusiva do meu trabalho.

À mestrandia e técnica do Lecer Renata Aquino, por toda dedicação e disponibilização em auxiliar-me nos experimentos.

À Me. Glauce Pigatto, pelas dicas e apoio emocional que contribuíram muito para a elaboração deste trabalho.

Ao meu aluno orientado de I.C, Carlos Sabino, que esteve todo o tempo ao meu lado e tanto me auxiliou com as pesquisas realizadas.

À aluna de biomedicina da UNIARA, Mariana Rios, pelo interesse e dedicação à esta pesquisa.

À CAPES, pelo auxílio financeiro a mim concedido.

À UNIARA, por tornar o meu sonho uma realidade.

Enfim, meus agradecimentos a todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização deste estudo que, sem as quais, tal realização não teria sido possível.

A todos, de coração, muito obrigada!

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”

(Mãre Teresa de Calcutá)

PRODUÇÃO DA BMP-2 RECOMBINANTE DE HUMANO (rhBMP-2) PARA FUNCIONALIZAÇÃO DE BIOPOLÍMEROS EM REPARO ÓSSEO

RESUMO

Proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) são fatores multifuncionais pertencentes à superfamília do fator transformante de crescimento beta (TGF- β), capazes de induzirem a formação de osso e cartilagem. A BMP-2 é considerada um dos fatores de crescimento mais importantes para a regeneração óssea, promovendo a quimiotaxia, proliferação e diferenciação celular no sentido da via osteogênica. Fraturas e defeitos ósseos de tamanho crítico são recorrentes na medicina ortopédica e os tratamentos convencionais trazem inúmeras desvantagens no processo de regeneração, representando um desafio no desenvolvimento de novas abordagens de tratamentos. A BMP-2 humana pode ser obtida por meio da tecnologia do DNA recombinante para ser incorporada a suportes biológicos de forma a estimular e orientar a regeneração do novo tecido. O objetivo deste trabalho foi desenvolver um sistema heterólogo de expressão da BMP-2 recombinante humana (rhBMP-2) para posterior imobilização em suportes biológicos. Previamente, o gene que codifica a BMP-2 humana foi obtido por PCR utilizando como DNA molde o DNA genômico de células humanas (MG-63). O vetor de expressão pET-32a(+) foi utilizado para clonagem do gene alvo sob controle do *operon lac*, resultando na produção da rhBMP-2 em fusão com a proteína tiorredoxina e um peptídeo N-terminal contendo seis resíduos de histidinas. Para a expressão da rhBMP-2, células de *Escherichia coli* BL21 (DE3) e *Escherichia coli* Rosetta (DE3) pLysS foram induzidas pela adição de isopropil β -D-1-tiogalactopiranosida. A rhBMP-2 foi expressa tanto em *E. coli* BL21 (DE3) como em *E. coli* Rosetta (DE3) pLysS, sendo que a obtenção da produção na forma solúvel foi melhor nesta última linhagem e a 20°C. Através dos ajustes implementados na purificação por cromatografia de afinidade, foi possível a obtenção da rhBMP-2 com alto grau de pureza. Através do ensaio de imunodeteção, foi comprovado que o a proteína produzida se trata da rhBMP-2. A atividade biológica da rhBMP-2 foi comprovada utilizando o ensaio de proliferação e viabilidade celular pelo método de MTT em células tronco mesenquimais e células de mioblastos C2C12 de ratos. Teste preliminar utilizando celulose modificada indicou que a rhBMP-2 foi capaz de estimular significativamente a proliferação celular.

Palavras-chave: rhBMP-2, clonagem, recombinante, regeneração óssea, suportes biológicos.

PRODUCTION OF A RECOMBINANT HUMAN BMP-2 (rhBMP-2) TO FUNCTIONALIZATION OF BIOPOLYMERS IN BONE REPAIR

ABSTRACT

Bone morphogenetic proteins (BMPs) are multifunctional factors which belong to the transforming growth factor beta (TGF- β) superfamily, capable of inducing bone and cartilage formation. The BMP-2 is considered one of the most important growth factor for bone regeneration, promoting chemotaxis, proliferation, cell differentiation towards the osteogenic pathway. Fractures and critical size bone defects are recurrent in orthopedic medicine and the conventional treatments bring numerous disadvantages to the regeneration process, posing a challenge in the development of new approaches to treatment. The human BMP-2 can be obtained by means of recombinant DNA technology to be incorporated in biological scaffolds in order to stimulate and to direct the regeneration of the new tissue. The objective of this study was to develop a heterologous human recombinant BMP-2 expression system (rhBMP-2) for subsequent immobilization in biological scaffolds. Previously, the gene encoding human BMP-2 was obtained by PCR using as template DNA the genomic DNA of human cells (MG-63). The pET-32a(+) expression vector was used to clone the target gene under control of the *lac operon*, resulting in the production of rhBMP-2 in fusion with the thioredoxin protein and an N-terminal peptide containing six histidine residues. For rhBMP-2 expression, *Escherichia coli* BL21 (DE3) and *Escherichia coli* Rosetta (DE3) pLysS cells were induced by the addition of isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside. The rhBMP-2 was expressed in both *E. coli* BL21 (DE3) and *E. coli* Rosetta (DE3) pLysS, and production in the soluble form was better in this latter strain and at 20° C. Through the adjustments implemented in the purification by affinity chromatography, it was possible to obtain rhBMP-2 with a high degree of purity. Through the immunodetection assay, it has been shown that the protein produced is treated with rhBMP-2. The biological activity of rhBMP-2 was demonstrated using the proliferation and cell viability assay by the MTT method in mesenchymal stem cells and rat C2C12 myoblast cells. Preliminary testing using modified cellulose indicated that rhBMP-2 was able to significantly stimulate cell proliferation.

Key-words: rhBMP-2, cloning, recombinant, bone regeneration, biological scaffolds.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Comunicação entre lacunas e canálculos.....	3
Figura 2 - Osso cortical compacto e esponjoso.....	4
Figura 3 - Dinâmica da formação do tecido ósseo e células envolvidas.....	6
Figura 4 - Células ósseas e suas atividades relacionadas à remodelação.....	8
Figura 5 - Sinalização das BMPs	10
Figura 6 - Esquema do gene da BMP-2 e da estrutura da proteína	12
Figura 7 - Estrutura terciária do dímero BMP-2	13
Figura 8 - Esquema do vetor da série pET.....	14
Figura 9 - Construção de um DNA recombinante	15
Figura 10 - Dogma central da biologia molecular.....	15
Figura 11 - Tríade da medicina regenerativa	19
Figura 12 - Vetor de clonagem pET-32a(+)	24
Figura 13 - Reação do enxofre (SH) com a ligação dupla da maleimida	31
Figura 14 - SDS-PAGE: Expressão e solubilidade da rhBMP-2 produzida em <i>E.coli</i> BL21 (DE3) pLysS BMP-2/32	33
Figura 15 - SDS-PAGE: Expressão e solubilidade da rhBMP-2 produzida em <i>E.coli</i> Rosetta (DE3) pLysS BMP-2/32	34
Figura 16 - SDS-PAGE: Purificação da rhBMP-2 produzida em <i>E.coli</i> BL21 (DE3) BMP-2/32 em coluna contendo resina de níquel e cobalto pré equilibrada com tampão Imidazol 5 mM, NaCl 0,5 M, Tris 20 mM, pH 7.9	36
Figura 17 - SDS-PAGE: Purificação da rhBMP-2 produzida em <i>E.coli</i> Rosetta (DE3) pLysS BMP-2/32 em coluna contendo resina de níquel pré equilibrada com tampão PBS 1x	37
Figura 18 - SDS-PAGE: Purificação da rhBMP-2 produzida em <i>E.coli</i> Rosetta (DE3) pLysS BMP-2/32 em coluna contendo resina de níquel pré equilibrada com tampões A: (PBS 1x + imidazol 25mM) e B: (PBS 1x + imidazol 10mM)	38

Figura 19 - Western Blotting das frações purificadas de rhBMP-2	39
Figura 20 - Ensaio de proliferação e viabilidade celular (MTT) em CTM	40
Figura 21 - Ensaio de proliferação e viabilidade celular (MTT) em células C2C12	40
Figura 22 - Ensaio de proliferação e viabilidade celular (MTT) utilizando a rhBMP-2 imobilizada na superfície de celulose modificada	41

LISTA DE ABREVIACOES, SÍMBOLOS E UNIDADES DE MEDIDAS

BCA	cido Bicinconínico
BCIP	5-Bromo-4-cloro-3-indolil fosfato
BMP	Proteína Morfogenética ssea
CaCl₂	Cloreto de Cálcio
cAMP	adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
CO₂	Dióxido de Carbono
CTM	Célula Tronco Mesenquimal
CV	Volume da coluna
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DNA	cido Desoxirribonucleico
DO	Densidade ptica
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FBS	Soro Fetal Bovino
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FGF	Fator de Crescimento Fibroblástico
HCl	cido Clorídrico
His	Histidina
IGF	Fator de Crescimento Insulnico
IL	Interleucina
IMAC	Cromatografia de Afinidade por íons Metálicos
IPTG	Isopropil- β -d-tiogalactopiranosídeo
LB	Luria Bertani
MgCl₂	Cloreto de magnésio
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NaCl	Cloreto de Sódio

NBT	Nitro Azul Tetrazólio
nHAC	nano-hidroxiapatita/colágeno
ORF	Fase de leitura aberta
PBS	Tampão fosfato-salino
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PLA	Poli (ácido láctico)
PLLA	Poli (ácido L-láctico)
PTH	Paratormônio
rH	Recombinante Humano
Rpm	Rotações por minuto
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
Tag	Marcador
TBS	Tampão Tris-Salino
TGF- β	Fator de crescimento transformador beta
Tris	Tris(hidroximetil)-aminometano
Trx	Tiorredoxina
α-MEM	<i>Minimum Essential Medium Eagle Alpha Modification</i>
°C	Graus Celsius
mM	Mili Molar
μl	Microlitro
ml	Mililitro
M	Molar
kDa	Kilodalton
%	Porcento

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1	O TECIDO ÓSSEO	3
2.2	AS CÉLULAS DO TECIDO ÓSSEO	4
2.3	REMODELAÇÃO ÓSSEA	6
2.4	AS PROTEÍNAS MORFOGENÉTICAS ÓSSEAS (BMPs)	9
2.5	PROTEÍNA MORFOGENÉTICA ÓSSEA 2 (BMP-2)	11
2.6	TECNOLOGIA DO DNA RECOMBINANTE	13
2.7	PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS POR IMAC	17
2.8	BIOPOLÍMEROS E MEDICINA REGENERATIVA	18
3	OBJETIVOS.....	22
3.1	OBJETIVO GERAL.....	22
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
4	MATERIAIS E MÉTODOS	23
4.1	CLONAGEM DO GENE DA BMP-2 NO PLASMÍDEO	23
4.2	PREPARO DE CÉLULAS COMPETENTES	25
4.3	TRANSFORMAÇÃO DE CÉLULAS COMPETENTES.....	25
4.4	EXPRESSÃO DA rhBMP-2.....	26
4.5	PURIFICAÇÃO DA rhBMP-2.....	27
4.6	ENSAIO DE IMUNODETECÇÃO	28
4.7	ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO E VIABILIDADE CELULAR	28
4.8	ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR UTILIZANDO A rhBMP-2 IMOBILIZADA NA SUPERFÍCIE DE CELULOSE MODIFICADA	30
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
6	CONCLUSÕES.....	42
7	PERSPECTIVAS FUTURAS	42
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43

1 INTRODUÇÃO

As técnicas clássicas de estabilização e enxertia utilizadas no reparo de fraturas complexas e defeitos ósseos de grande extensão podem interferir na evolução da cicatrização do osso. O uso de enxertos ósseos possui algumas limitações como quantidade do enxerto a ser obtida, maior tempo de recuperação no pós-operatório, risco de transmissão de doenças, reações imunológicas e necessidade de manutenção de um banco de ossos quando se trata de aloenxertos (BAUER; MUSCHLER, 2000).

Os primeiros questionamentos sobre processos que determinam a neoformação óssea, em sítios desprovidos de tecidos ósseos, foram baseados na descoberta de Urist (URIST, 1965). Para ele um fator central seria o responsável por este efeito. Esse fator foi relatado como uma substância indutora de formação óssea, presente na matriz, denominada proteína morfogenética óssea (BMP) (SANTOS et al., 2005). As BMPs representam um grupo de fatores de crescimento pertencente à superfamília dos fatores de crescimento transformante β (TGF- β). Aproximadamente 20 subtipos de BMPs essenciais para a regulação do crescimento, diferenciação e apoptose de vários tipos celulares, incluindo osteoblastos, condroblastos, células neurais e epiteliais, foram descritos até agora (SAKOU, 1998). Dentre as BMPs, a BMP-2 representa um dos principais fatores de crescimento implicado na regeneração e crescimento do osso e da cartilagem, exibindo pronunciadas propriedades de osteoindução (URIST, 1971). Normalmente está localizada no tecido ósseo, sendo liberada em resposta ao dano ósseo, o que acarreta no estímulo da diferenciação da célula mesenquimal em osteoblastos e finalmente induz a proliferação celular. Sua principal função é a manutenção da osteogênese (SHARAPOVA et al., 2010).

As BMPs estão sendo cada vez mais utilizadas na reconstrução óssea, incorporadas a suportes eficazes (BODEN et al., 2005) que as liberam lenta e gradualmente, permitindo assim o reparo do osso. Elas podem ser isoladas diretamente dos ossos, mas o rendimento é muito limitado (WANG et al., 1988), além de existir também potencial risco de transmissão de doenças relacionado ao isolamento do osso doador (KIRKER-HEAD, 2000). No entanto, as BMP-2 comercializadas são produzidas fora do Brasil através da tecnologia do DNA recombinante humano (rhBMP), utilizando cultura de células de mamíferos (InFUSE; Medtronic Sofamor Danek, Memphis TN, USA) ou através de cultura bacteriana, utilizando *Escherichia coli* (Cowellmedi Co., Ltd, Seoul, Republic of Korea). Para que seja desenvolvido um produto comercial viável, o custo de aquisição também deve ser

considerado. O baixo rendimento e o elevado custo na produção da rhBMP-2 em sistema eucarioto de expressão da proteína tem sido considerado problemático para a aplicação clínica (LEE et al., 2010). Contudo, pesquisas em torno da produção de uma rhBMP-2 eficaz, com baixo custo, alta biossegurança e alto rendimento são cada vez maiores e a utilização de *E. coli* como sistema de expressão está atualmente em estágio crescente de desenvolvimento por representar um sistema de produção rápido e econômico dessas proteínas (LONG et al., 2006; ZHANG et al., 2009, LEE et al., 2010), traduzindo-se em grande importância para a indústria biotecnológica.

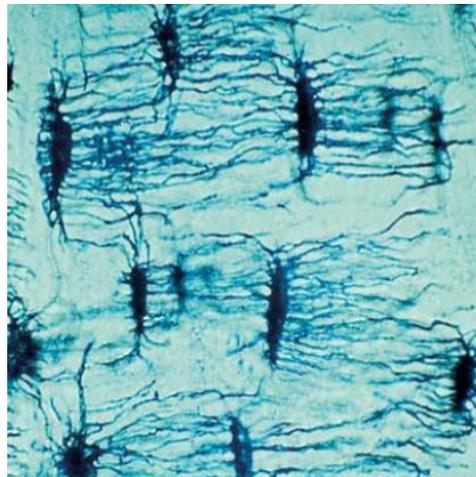
Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi desenvolver um método viável de obtenção da rhBMP-2 por meio de um sistema de expressão bacteriano, para utilização destas proteínas na imobilização em suportes biológicos desenvolvidos pelo grupo de medicina regenerativa dos Laboratórios QUIMMERA e BioPolMat da UNIARA, para funcionalização dos suportes no processo de celularização.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O TECIDO ÓSSEO

O tecido ósseo é um tipo especializado de tecido conjuntivo altamente vascularizado que é constituído por células e por uma matriz óssea firme, enriquecida por depósitos de sais de cálcio, com a característica exclusiva de mineralizar. As células são: os osteócitos, que situam-se em cavidades ou lacunas no interior da matriz; os osteoblastos, que sintetizam a parte orgânica da matriz e localizam-se na sua periferia; e os osteoclastos, células gigantes, móveis e multinucleadas que reabsorvem o tecido ósseo, participando dos processos de remodelação do osso. Como não existe difusão de substâncias através da matriz calcificada do osso, a nutrição dos osteócitos depende de canalículos que existem na matriz. Esses canalículos possibilitam as trocas de moléculas e íons entre os capilares sanguíneos e os osteócitos (Fig. 1). (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

Figura 1. Comunicação entre lacunas e canalículos.

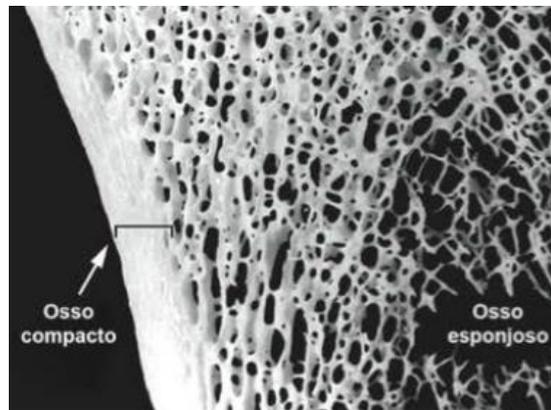


Fonte: Junqueira e Carneiro, 2013 (Adaptado).

As superfícies internas e externas dos ossos são recobertas por células osteogênicas e tecido conjuntivo, que constituem o endóstio e o perióstio, que têm como função a nutrição do tecido ósseo. Nessas superfícies também estão presentes osteoblastos, osteoclastos e outras células importantes do metabolismo ósseo, que contribuem significativamente para o processo regenerativo e remodelativo do osso (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

Macroscopicamente, o tecido ósseo pode ser classificado em compacto (cortical) e esponjoso (trabecular) (Fig. 2). O tecido ósseo compacto apresenta funções mecânicas e de proteção, enquanto que o esponjoso se ocupa das funções metabólicas e funções de suporte. Em termos histológicos o tecido ósseo pode ser classificado em primário (imaturo) e secundário (maduro). O tecido primário se apresenta em disposição irregular e não organizada de fibras colágenas com menor quantidade de cristais de hidroxiapatita, o tecido secundário é composto por fibras colágenas dispostas em lamelas paralelas ou concêntricas, formando osso compacto ou esponjoso (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

Figura 2. Osso cortical compacto e esponjoso.



Fonte: Junqueira e Carneiro, 2013.

Apesar de sua estrutura dura e inflexível, o osso é um tecido dinâmico continuamente reabsorvido, renovado e remodelado. Esses processos são desenvolvidos pelas células ósseas as quais são reguladas por vários fatores transcricionais, por citocinas e fatores de crescimento (ROBBINS; COTRAN, 2010). As células osteoprogenitoras são células-tronco mesenquimais pluripotentes, encontradas nas proximidades de todas as superfícies ósseas. Ao serem estimuladas de modo apropriado por fatores de crescimento, elas sofrem divisão celular e produzem descendentes que se diferenciam em osteoblastos (ROBBINS; COTRAN, 2010).

2.2 AS CÉLULAS DO TECIDO ÓSSEO

Os osteoblastos (Fig. 3) são células mononucleadas, de origem mesenquimal, e aspecto cubóide ou ligeiramente alongadas que formam uma camada celular contínua sobre a superfície óssea que está sendo formada. O osteoblasto ativo é caracterizado por possuir uma

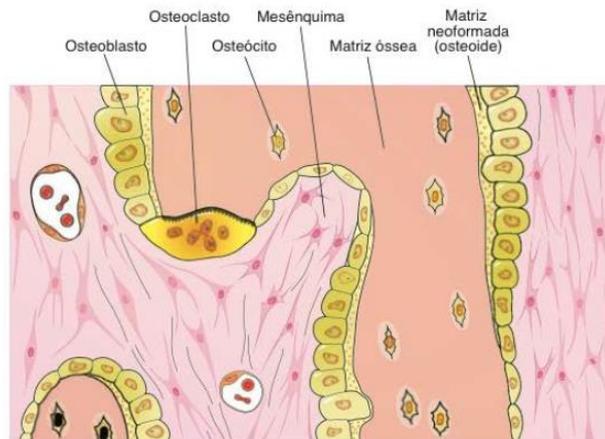
membrana citoplasmática rica em fosfatase alcalina, receptores para uma variedade de hormônios e fatores de crescimento, sendo responsável pela formação da matriz orgânica do osso e pela sua mineralização (AUBIN; TURKSEN; HEERSCHÉ, 1993; MACKIE, 2003). A matriz orgânica sintetizada pelos osteoblastos é constituída por várias proteínas tais como colágeno tipo I, osteocalcina, osteopontina, proteoglicanas, fosfoproteínas e citocinas. Estes componentes interagem entre si e organizam-se, fornecendo um arcabouço que permite a deposição de sais minerais, além do fato de algumas destas moléculas atuarem diretamente na mineralização (RAISZ; RODAN, 1998). Os osteoblastos secretam fatores locais de regulação responsáveis pela proliferação, diferenciação e atividade osteoblástica, como as proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs), que são membros da família da TGF- β e exercem importante função na diferenciação de células mesenquimais em osteoblastos. Os osteoblastos podem se transformar em osteócitos quando circundados pela matriz orgânica recém-depositada ou, de modo alternativo, podem tornar-se células de revestimento ósseo, achatadas e quiescentes, na superfície óssea (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

Os osteócitos (Fig. 3) são células descendentes de células estaminais mesenquimais por meio de diferenciação dos osteoblastos e estão localizados dentro da matriz óssea. À medida que secretam a matriz, ficam aprisionados no seu interior em lacunas (BONEWALD, 2011). Comunicam-se entre si e com células da superfície óssea por meio dos canalículos, que atravessam túneis na matriz. Caracterizam-se pela pobre atividade metabólica, porém indispensável para a manutenção da homeostase óssea. Secretam a osteocalcina, proteína não colagenosa que exerce função na mineralização óssea e homeostase do cálcio no organismo. Os osteócitos são responsáveis pela mecanotransdução, ou seja, detectam forças mecânicas traduzindo-as em atividade biológica (ROBLING et al., 2008).

As células de revestimento ósseo são os osteoblastos, quando quiescentes, recobrimo as superfícies ósseas. Exibem escassas organelas de síntese e secreção de proteínas e formam uma camada contínua de células interconectadas, capaz de manter a homeostase da matriz óssea, influenciando no metabolismo de cálcio e fosfato, sendo também responsáveis pela troca de substâncias (MUNDY, 1991). Estas células podem ter um papel importante na diferenciação de células mesenquimatosas, na regulação da homeostasia mineral, na inibição da atividade anabólica dos osteoblastos e também parecem influenciar a atividade dos osteoclastos (HALSEY; MC LEOD; RUBIN, 1997). Segundo autores, estas células podem produzir colagenase, enzima com capacidade de digerir a matriz orgânica, e preparar a reabsorção osteoclástica (MARTIN et al., 1993).

Os osteoclastos (Fig. 3) são células multinucleadas responsáveis pela reabsorção óssea e não pertencem à mesma linhagem celular de onde se originam os osteoblastos. Ao contrário, os osteoclastos derivam da linhagem celular progenitora hematopoiética, ou seja, a mesma que origina os monócitos e macrófagos na medula óssea. Os osteoclastos são encontrados na superfície dos ossos em pequenas depressões, denominadas lacunas de Howship. Após ligarem-se à matriz óssea-alvo, os osteoclastos produzem um ambiente ácido isolado necessário para a remoção mineral, favorecendo a reabsorção óssea e desencadeando a remodelação constante do osso, importante para a manutenção do esqueleto (ROBBINS; COTRAN, 2010).

Figura 3. Dinâmica da formação do tecido ósseo e células envolvidas.



Fonte: Junqueira e Carneiro, 2013.

2.3 REMODELAÇÃO ÓSSEA

O tecido ósseo, em diversos momentos, precisa passar por variações para que possa crescer mantendo sua forma, a fim de torna-se maduro ou adaptar-se a novas situações fisiológicas ou patológicas. Desta forma, o osso está em constante remodelação, por meio de reabsorção e deposição de matriz óssea, que são processos estreitamente acoplados. O desenvolvimento e a homeostase do sistema esquelético está na dependência de uma remodelação óssea equilibrada, ou seja, da dinâmica balanceada entre a atividade dos osteoblastos e osteoclastos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013; ANDIA; CERRI; SPOLIDORIO, 2006).

O primeiro evento celular na sequência de remodelação é a formação e ativação dos osteoclastos. Previamente à reabsorção da matriz mineralizada pelos osteoclastos, os

osteoblastos e células de revestimento ósseo produzem collagenase, removendo a camada de osteóide, expondo a matriz mineralizada aos osteoclastos que se tornam ativos em contato direto com a matriz óssea mineralizada (MARKS; POPOFF, 1988). Outra possibilidade de modular a formação e atividade osteoclástica seria a partir de sinais gerados no microambiente, com a liberação de citocinas. As citocinas são moléculas de regulação, solúveis, de baixo peso molecular, expressas como proteínas de membrana ou secretadas, que se ligam a receptores específicos, em células alvo. Elas têm um papel vital tanto na regulação do tecido ósseo em condições fisiológicas quanto patológicas (ANDIA; CERRI; SPOLIDORIO, 2006).

A formação do osso envolve a proliferação e migração das células osteoprogenitoras e a diferenciação dos osteoblastos. Os osteoblastos, por serem células completamente diferenciadas, apresentam capacidade limitada de migração e proliferação. Assim, para a formação óssea em um sítio determinado, células progenitoras mesenquimais indiferenciadas (osteoprogenitoras) migram até o sítio e diferenciam-se em osteoblastos (WATZEK, 2004). Este processo é controlado por uma cascata de eventos combinados a uma programação genética como a regulação de genes por fatores sistêmicos e locais, entre eles os hormônios, citocinas e fatores de crescimento (SODEK, MC KEE; 2000). Vários fatores de crescimento são responsáveis pela diferenciação osteoblástica, como os fatores de crescimento transformante beta (TGF- β) e os membros pertencentes a este grupo, as proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) (WATZEK, 2004).

A maioria dos fatores que controla a reabsorção óssea tais como PTH, 1,25 dihidroxivitamina D₃, esteróides sexuais, prostaglandinas, citocinas (Interleucina-1, Interleucina-6 e Interleucina-11) e TGF- β , age diretamente nos osteoblastos. Portanto, estes fatores estimulam os osteoblastos a liberarem moléculas que estimulam a migração e adesão celular à superfície óssea a qual deve ser reabsorvida. Desta forma, os osteoblastos participam do processo de remodelação produzindo matriz óssea e controlando a atividade dos osteoclastos. As citocinas e os fatores de crescimento, especialmente o TGF- β , liberados da matriz durante sua degradação, atuam como uma alça de “feed-back” e desencadeiam a formação e ativação de osteoblastos para sintetizar e depositar uma quantidade equivalente de osso novo na lacuna de reabsorção (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004; ANDIA; CERRI; SPOLIDORIO, 2006).

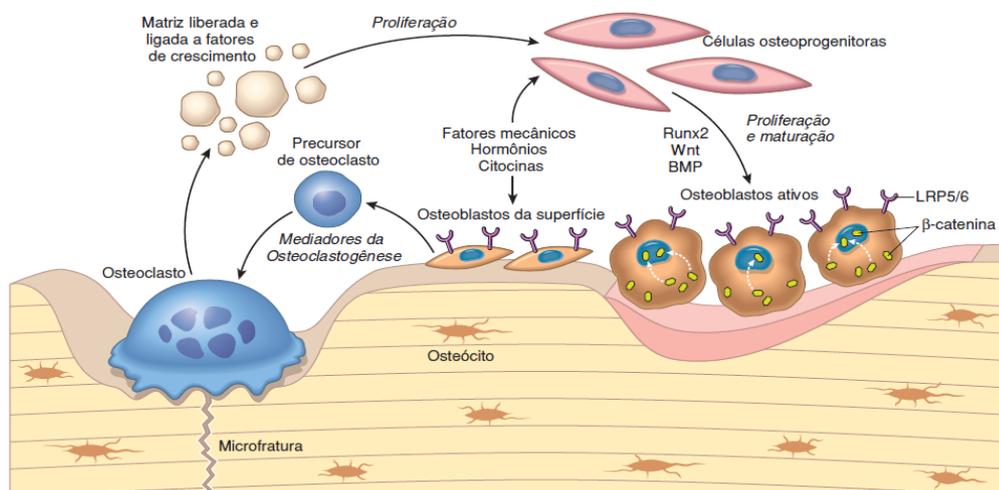
Os TGF- β são proteínas diméricas (25 kDa), secretadas por diversos tipos celulares, incluindo células presentes no tecido ósseo, sendo elas os osteoblastos, osteócitos, osteoclastos e condrócitos (BOSTROM; ASNIS, 1998). É o mais abundante dos fatores de

crescimento armazenado no osso. São produzidos quando há estímulo para reabsorção óssea, podendo ser um mecanismo importante na desativação osteoclástica (MUNDY, 1991). São armazenadas na matriz osteóide e nas plaquetas na forma inativa, como um complexo pró-peptídeo de alto peso molecular (100-250 kDa). Sua concentração é aproximadamente cem vezes maior no osso que em qualquer outro tecido. Sua ativação e clivagem ocorrem em meio ácido (como durante a fase inicial, inflamatória, do processo de consolidação) ou por ação de enzimas proteolíticas (BOSTROM; ASNIS, 1998). Os TGF- β estimulam a formação óssea e também podem inibir a diferenciação, formação e atividade dos osteoclastos maduros (EPSTEIN et al., 1990).

As BMPs são fatores de crescimento pertencentes à superfamília dos TGF- β , essenciais para a regulação do crescimento, diferenciação e apoptose de várias células, incluindo osteoblastos, condroblastos, células neurais e epiteliais. Elas são expressas em abundância no local de reparação óssea, iniciando a atração, proliferação e diferenciação de células precursoras de osteoblastos no local lesado e são cada vez mais pesquisadas devido à demanda por requisitos para a reparação óssea (WATZEK, 2004).

Apesar de ter uma grande capacidade regenerativa, em algumas situações, a resposta do organismo é insuficiente para o reparo completo de uma lesão, como em casos de lesões ósseas extensas causadas por infecções, tumores e defeitos congênitos. Devido a esses fatores, inúmeros trabalhos têm sido realizados, procurando alternativas para auxiliar e estimular a regeneração óssea, desenvolvendo assim, diversos materiais osteosubstitutos e técnicas alternativas de tratamento (VALENZUELA, 2008).

Figura 4. Células ósseas e suas atividades relacionadas à remodelação.



Fonte: Robbins e Cotran, 2010.

2.4 AS PROTEÍNAS MORFOGENÉTICAS ÓSSEAS (BMPs)

As BMPs são fatores de crescimento multifuncionais de baixo peso molecular (19 a 30 kDa) que pertencem à superfamília dos TGF- β (CHEN; ZHAO; MUNDY, 2004) e possuem forte capacidade de induzir a formação de osso e cartilagem a partir de células tronco mesenquimais (VAN HOUT et al., 2011; SUN et al., 2015). Essas proteínas exercem importante função em diversos tecidos, atuando em processos como a proliferação, diferenciação, morfogênese e apoptose celular (DUCY; KARSENTY, 2000; KATAGIRI; SUDA; MIYAZONO, 2008; MIAZONO; KAMIYA; MORIKAWA, 2010).

A atividade biológica original das BMPs foi reportada por Marshal Urist em 1965. Ele preparou uma matriz óssea desmineralizada de pequenos vertebrados e tratou com ácido clorídrico (HCl). Esta matriz óssea foi implantada no tecido muscular esquelético de outros hospedeiros vertebrados. Urist descobriu, então, que tecido ósseo "vivo", que incluiu medula óssea, foi induzido na matriz óssea "morta" dentro de várias semanas. A atividade óssea induzida observada na matriz óssea desmineralizada foi encontrada não apenas no músculo esquelético, mas também nos defeitos ósseos (URIST, 1965). Suas descobertas sugeriram que a matriz óssea continha atividade indutora óssea até então desconhecida e que os tecidos musculares esqueléticos continham uma ou mais células capazes de se diferenciarem em células formadoras de osso (KATAGIRI; OSAWA; TSUKAMOTO, 2015). Essa atividade indutora era exercida pelo que ele chamou de proteínas morfogénéticas ósseas (BMP). No entanto, o isolamento da primeira BMP, a partir de extrato de osso bovino, só ocorreu na década de 1980 (BMP-3, osteogenina), com a subsequente clonagem das BMPs 2 e 4 (WOZNEY; ROSEN; CELESTE, 1988).

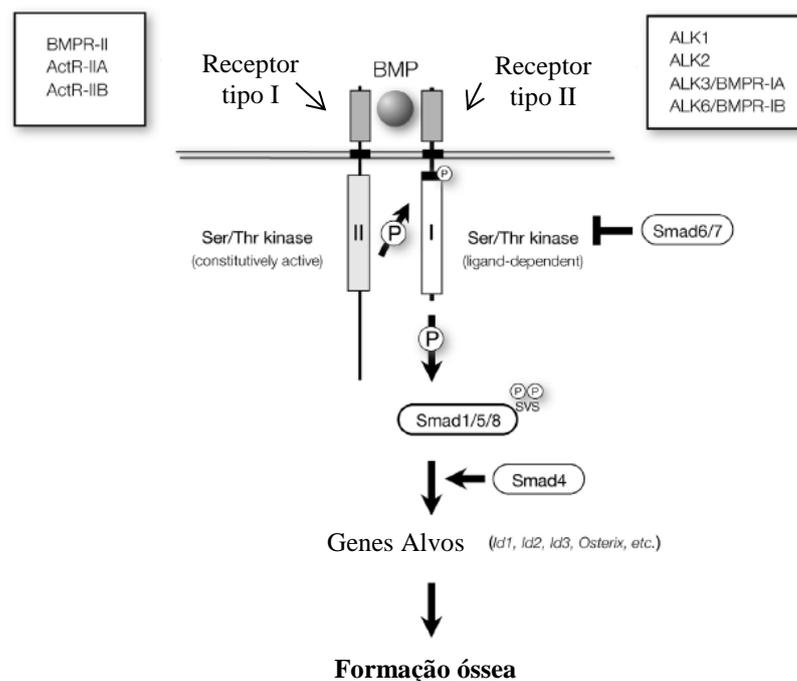
Desde sua descoberta, mais de 20 BMPs homodiméricas ou heterodiméricas foram descritas em humanos e outras espécies, desempenhando um papel crucial no desenvolvimento e função de muitos tipos de células em vários tecidos. Com base na homologia estrutural, os membros da família BMP podem ser ainda classificados em vários subgrupos, incluindo o grupo BMP-2 / -4, grupo BMP-5 / -6 / -7 (OP-1) / 8, BMP-9 / -10, e grupo BMP-12 / -13 / -14 (GDF-5 / -6 / -7). Entre os membros da família BMP, apenas a BMP-1 tem uma estrutura metaloproteínase e atua como uma propeptidase carboxi-terminal para o colágeno tipo I, portanto, não fazendo parte da família TGF- β (SENTA et al., 2009; POON et al., 2016; BEGAM et al, 2016).

As BMPs são sintetizadas como uma molécula precursora, constituída por um peptídeo sinal, um pró-domínio e uma região carboxi-terminal, aonde se localiza a sequência

da proteína madura que contém entre 100 a 140 resíduos de aminoácidos (SENTA et al., 2009). Dentro da região carboxi-terminal da maior parte das BMPs existem sete resíduos de cisteína conservados, altamente importantes para o enovelamento correto destas moléculas diméricas, das quais seis formam pontes dissulfeto intramolecular, enquanto que os resíduos remanescentes formam pontes dissulfeto intermolecular, permitindo a formação de homodímeros, os quais são indispensáveis para a sua atividade biológica (CARREIRA et al., 2014).

No tecido ósseo as BMPs são produzidas pelas células osteoprogenitoras, osteoblastos, condrócitos e plaquetas. Após sua síntese, a matriz extracelular as armazena temporariamente, e são liberadas durante a reparação e remodelação óssea (CARREIRA et al., 2014). Os efeitos reguladores das BMPs dependem do tipo de célula-alvo, sua fase de diferenciação, sua concentração e interações com outras proteínas secretadas. As BMPs, tal como outros membros da família TGF- β , exercem os seus efeitos através de dois tipos de receptores transmembrana de serina-treonina cinase, receptores tipo I e II. O receptor tipo II fosforila o receptor tipo I que, ativado, fosforila smad 1/5/8. Fosforilada, smad 1/5/8 formam complexos com smad 4 e regulam a transcrição de genes alvo que induz a formação óssea (Fig. 5). (KATAGIRI; OSAWA; TSUKAMOTO, 2015).

Figura 5. Sinalização das BMPs.



Fonte: Katagiri et al., 2015, adaptado.

As BMPs são potentes indutoras da osteogênese durante a fase de formação óssea embriológica e nos casos de reparos de fraturas. Elas induzem uma cascata de eventos que levam à condrogênese, osteogênese, angiogênese e síntese controlada de matriz extracelular (LISSEBERG-THUNNISSEN, 2011). A ossificação induzida por BMPs pode ocorrer através de uma formação cartilaginosa prévia (ossificação endocondral ou indireta), que estimula células indiferenciadas a se multiplicarem e se diferenciarem, inicialmente, em fenótipo condroblástico, originando previamente um tecido cartilaginoso que servirá como base para a migração e diferenciação de células indiferenciadas em osteoblastos (REBECCA et al., 2001); ou através da diferenciação de células progenitoras diretamente em células ósseas (ossificação intramembranosa ou direta) (SOLOFOMALALA et al., 2007; FREITAS et al., 2012).

Devido ao potencial osteoindutivo e osteocondutivo das BMPs, vários estudos *in vitro* e *in vivo* têm sido realizados desde a descoberta destas proteínas, visto que estes fatores tornaram-se de grande interesse em diversas áreas da medicina. Entre todos os membros da família BMP, a BMP-2 é a que exibe mais fortemente a atividade osteogênica (KIM et al., 2014). Os resultados de numerosos estudos demonstram que a BMP-2 é capaz de estimular a osteogênese e seu potencial de regeneração é igual ou superior ao do material ósseo autólogo (MC KAY; PECKHAN; BADURA, 2007; BESSA; CASAL; REIS, 2008).

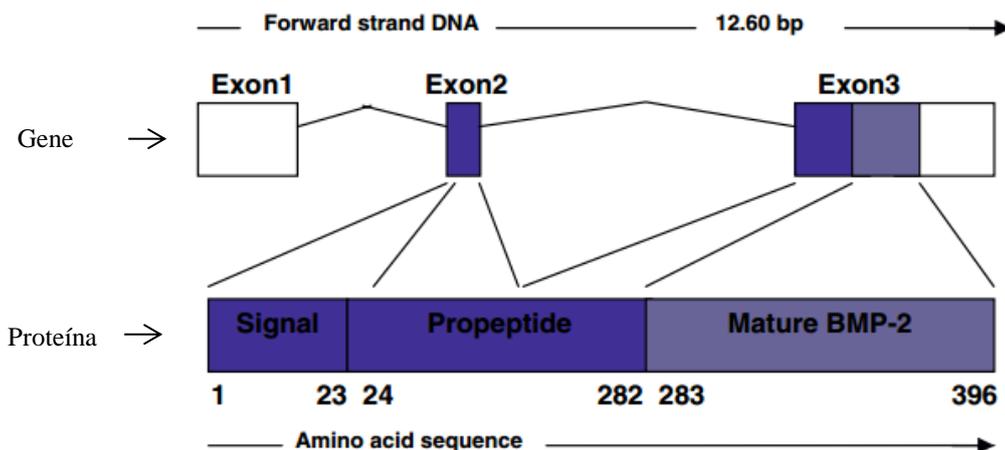
2.5 PROTEÍNA MORFOGENÉTICA ÓSSEA 2 (BMP-2)

A BMP-2 é uma glicoproteína de baixo peso molecular pertencente ao grupo de proteínas da matriz óssea. A proteína precursora de 396 aminoácidos é glicosilada, proteoliticamente clivada e dimerizada para se obter a BMP-2 homodimérica madura que consiste em duas subunidades de 113 resíduos na sequência C-terminal. Como outros membros da superfamília TGF- β , a BMP-2 tem seis resíduos de cisteínas que formam ligações dissulfeto intrapolipeptídicas e uma cisteína que forma uma ponte dissulfeto intercadeias, conectando os dois monômeros para formar um dímero ativo (WOZNEY, 1998; SCHEUFLER et al., 1999; LONG et al., 2006). Durante a diferenciação osteogênica *in vitro*, a BMP-2 potencializa a expressão gênica de marcadores osteogênicos, sendo uma das mais osteoindutivas, ou seja, capaz de induzir a formação óssea, promover a quimiotaxia, a proliferação e a diferenciação celular (KOBAYASHI et al., 2009; QIN et al., 2012; LEE et al., 2013; KIM et al., 2014).

O uso da BMP-2 foi aprovado em 2002 pela *Food and Drug Administration* (FDA) para aplicações clínicas como fratura de ossos longos e regeneração de discos intervertebrais, sendo utilizada incorporada a implantes que liberam as proteínas lenta e gradualmente, permitindo a regeneração óssea (MC KAY, PECKHAN, BADURA, 2007; JEONG, SANDHU, FARMER, 2005).

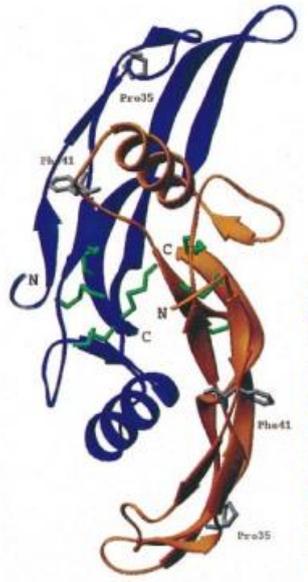
Embora as BMPs possam apresentar atividade mesmo em doses baixas no local da fratura, a obtenção de miligramas desta proteína parcialmente pura a partir de extratos ósseos desmineralizados requer quilogramas de material inicial (GAO, et al., 1996). Tais custos levam à busca de novas metodologias de obtenção destas proteínas, assim como a necessidade de verificar a participação dos vários fatores no processo de indução óssea. Contudo, a produção de BMPs recombinantes (rBMP), permitiu maiores conhecimentos quanto ao modo de utilização destas proteínas para a neoformação óssea, além de se tornar viável sua produção em alta escala.

Figura 6. Esquema do gene da BMP-2 e da estrutura da proteína. O gene BMP-2 contém três éxons representados por caixas e dois introns correspondentes às linhas. A região de codificação é representada por caixas roxas (escuras e clara) localizadas nos exons 2 e 3 do gene. O domínio maduro da proteína BMP-2 humana está totalmente localizado no éxon 3 correspondente aos aminoácidos 283-396 (caixa roxa clara da proteína).



Fonte: Bessa et al., 2008.

Fig 7. Estrutura terciária do dímero BMP-2. As subunidades são codificadas pelas cores azul e laranja. As α -hélices são representadas por espirais, as cadeias β por setas e as pontes dissulfeto por hastes verdes.



Fonte: Scheufler et al., 1999.

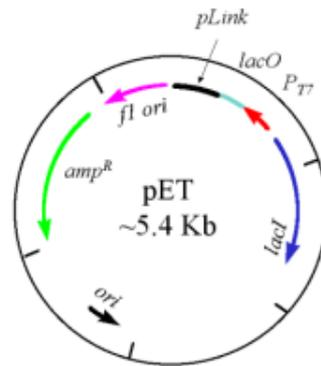
2.6 TECNOLOGIA DO DNA RECOMBINANTE

Moléculas de DNA artificial contendo segmentos covalentemente ligados, derivados de duas ou mais fontes, são chamados de DNAs recombinantes (LEHNINGER, 2011). A tecnologia do DNA recombinante envolve modificação direta do DNA, de forma a alterar características do organismo vivo ou introduzir novas características. O isolamento dos genes de interesse é conduzido por meio de técnicas de clonagem molecular que consistem em induzir um organismo vivo a amplificar a sequência de DNA de interesse, em sistemas que permitem uma fácil purificação e recuperação do referido fragmento de DNA. Para isso, são utilizados vetores de clonagem, nos quais a sequência de DNA de interesse é inserida (FERRAZ, 2007).

Atualmente, existem diversos vetores usados na tecnologia do DNA recombinante que apresentam características que os tornam excelentes veículos de clonagem, dentre eles, os plasmídeos, nos quais, grande parte é formada por moléculas de DNA dupla fita, contendo os elementos necessários para a sua replicação autônoma. Os vetores da série pET são plasmídeos desenhados para permitir rápida produção de grandes quantidades da proteína de interesse. Estes plasmídeos contêm vários elementos importantes: o gene *lacI*, que codifica a proteína repressora *lac*; o promotor T7, que é específico para T7 RNA polimerase; um

operador *lac*, que serve para bloquear a transcrição; um sítio de policlonagem; uma origem *f1* de replicação e um gene que garante resistência a um determinado antibiótico como, por exemplo, a ampicilina no caso do vetor pET-32a(+) (FELICIANO, 2009).

Figura 8. Esquema do vetor da série pET. O plasmídeo contém a região marcadora para resistência a ampicilina (verde), o gene *lac I* (azul anil), o promotor de transcrição T7 (vermelho), o operador *lac* (azul celeste) e um sítio de policlonagem (preto).

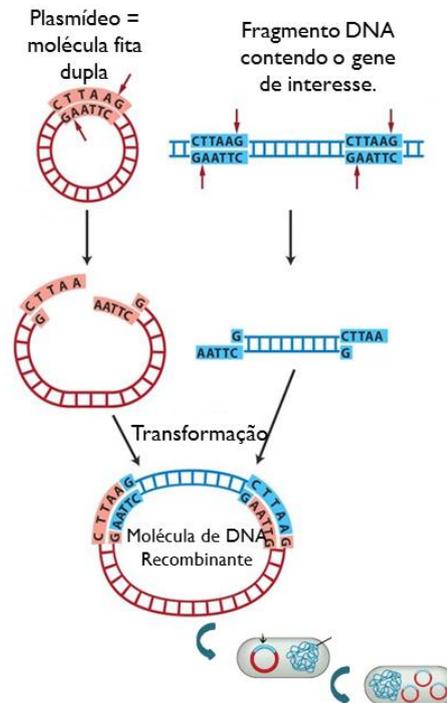


Fonte: Feliciano, 2009.

O gene de interesse é clonado no sítio de policlonagem. Quando T7 RNA polimerase está presente e o operador *lac* não está sendo reprimido, a transcrição do gene de interesse procede rapidamente. Como células de procariotos não produzem T7 RNA polimerase, esta deve ser adicionada. Usualmente, a célula hospedeira para este sistema de expressão é uma bactéria que tenha sido geneticamente modificada para incorporar o gene T7 RNA polimerase, o promotor *lac* e o operador *lac* em seu genoma. Quando lactose, ou uma molécula similar à lactose, como IPTG (isopropil- β -D-galactosídeo), está presente dentro da célula, a transcrição de T7 RNA polimerase é ativada (FELICIANO, 2009).

Uma vez isolado o gene de interesse e os fragmentos de DNA incorporados no genoma do organismo alvo, o organismo geneticamente modificado passa a ter características hereditárias (FERRAZ, 2007).

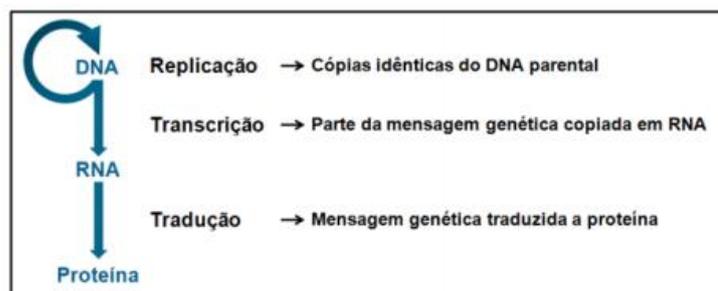
Figura 9. Construção de um DNA recombinante. A técnica do DNA recombinante consiste no isolamento de um gene de interesse e introdução deste em outro organismo em um processo de transformação, para que as células clonadas sejam propagadas.



Fonte: <http://slideplayer.com.br> em 6/05/2017, adaptado.

A tecnologia do DNA recombinante possibilita a produção de proteínas heterólogas em grande quantidade. O entendimento do dogma central da biologia molecular, o qual envolve replicação, transcrição e tradução, é essencial para a produção de proteínas recombinantes. Desta forma, proteínas de interesse biotecnológico podem ser produzidas em grande escala, utilizando-se principalmente sistema procarioto (LEHNINGER, 2011).

Figura 10. Dogma central da biologia molecular. Os três processos principais que a célula utiliza para que a mensagem genética seja expressa.



Fonte: Lehninger, 2011, adaptado.

BMPs podem ser isoladas diretamente do osso, porém o rendimento é muito limitado. Além disso, riscos de transmissão de doenças ou rejeição associado ao isolamento do osso doador alogênico limita sua aplicação clínica (GARRIDO; SAMPAIO, 2010). No final dos anos 80, as primeiras sequências codificadoras das proteínas da família das BMPs foram clonadas, abrindo a possibilidade de futura aplicação desta proteína na terapêutica (CELESTE et al., 1990; WANG, et al., 1988). A partir da introdução da tecnologia do DNA recombinante foi possível produzir sinteticamente BMPs recombinantes (rhBMP). As rhBMP possuem propriedades não antigênicas e não imunogênicas, não havendo risco de transferência de doenças humana, pois se trata de uma proteína produzida por princípios de bioengenharia (GENETICS INSTITUTE, Cambridge Mass, unpublished reports, 1995).

Atualmente, a produção de rhBMPs é realizada principalmente por sistema procarioto, por oferecer vantagens importantes como rápida produção com baixo custo, alta biossegurança e alto rendimento. Um sistema amplamente aceito para a produção de proteínas recombinantes é a utilização de *E.coli*, por resultar em produção rápida e econômica dessas proteínas (LONG et al., 2006; ZHANG et al., 2009). Com isso, foram desenvolvidas inúmeras linhagens de *E. coli* geneticamente modificadas para diferentes condições de expressão, bem como vetores a serem utilizados, ambos disponibilizados comercialmente (GOPAL, 2013).

O vetor pET com etiqueta contendo 6-Histidinas (6xHis-tag), geralmente é a primeira escolha para obtenção de uma proteína recombinante pois possui uma pequena etiqueta de histidina e altos níveis de expressão devido à presença de um forte promotor, o T7. A linhagem de *E. coli* BL21 é a mais utilizada para a expressão devido à ausência de proteases importantes. A estirpe BL21 (DE3) possui um gene que codifica a T7 RNA polimerase, bem como a ausência das proteases Lon e OmpT, o que colabora com a minimização da degradação proteolítica. A linhagem Rosetta é derivada da BL21 (DE3), e foi concebida para aumentar a expressão de proteínas heterólogas contendo códons raramente utilizados em *E. coli* (GOPAL, 2013).

Quando se trata de produção heteróloga, espera-se que a proteína de interesse seja estável, não tóxica para a bactéria, solúvel, expressa em grande quantidade e que possa ser facilmente purificada. Embora seja possível produzir rhBMP-2 em forma solúvel em bactérias usando proteínas de fusão (IHM et al., 2008), os rendimentos permanecem baixos. Portanto, a maioria dos grupos se concentra na superprodução da proteína em *E. coli* na forma de corpos de inclusão citoplasmática (LONG et al., 2006; VALLEJO et al., 2002; VON EINEM et al., 2010), sendo necessário o processo de *refolding* para torna-la biologicamente ativa e apta para

uso, o que geralmente acarreta baixo rendimento da proteína nativa, e aumento de gastos (LONG et al., 2006; ZHANG et al., 2009).

Estudos demonstraram que o efeito terapêutico de rhBMP-2 depende da sua quantidade, concentração e tempo de aplicação (KING et al., 2002; PANG et al., 2004), portanto, sistemas de transporte adequados são fundamentais para a entrega, retenção e liberação da BMP-2 no local implantado, a fim de atingir o seu efeito osteoindutor. Em um estudo com 195 pacientes submetidos à cirurgia de fusão vertebral, foi verificado que os pacientes sem fatores de risco de saúde relacionados à falha de fusão e que receberam aplicação da rhBMP-2 apresentaram fusão vertebral em tempo significativamente menor que o enxerto autólogo na mesma condição (LEE et al., 2013). Na Medicina, destacam-se os tratamentos com rhBMP-2 da espondilose, aceleração da consolidação de fraturas de não união em ossos longos, reconstrução de ligamentos em ortopedia, pseudoartrose, aplicações regenerativas, entre outras (BISPO, 2015).

Devido aos excelentes resultados relatados em trabalhos com o uso de rhBMP-2 em humanos na área odontológica e médica, o FDA (*Food and Drug Administration*), órgão regulador de produtos na área da saúde nos EUA, aprovou em 2002 a comercialização da rhBMP-2, a qual foi introduzida no mercado com o nome de Infuse Bone Graft®. Este produto passou a ser utilizado em larga escala no tratamento de doenças e traumas ósseos na coluna vertebral em humanos e, em 2004, como tratamento coadjuvante em fraturas de tíbia. Em março de 2007, o uso de rhBMP-2 foi aprovado para uso na área odontológica (FREITAS et al., 2012).

Recentemente, pesquisadores têm mostrado interesse em novos materiais capazes de serem associados à rhBMP-2, especialmente os biopolímeros, visando acelerar e incrementar o processo de reparo ósseo em modelos de fraturas (ISSA et al., 2011; LI et al., 2011; LI et al., 2015).

2.7 PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS POR IMAC

Os princípios fundamentais da afinidade de biomoléculas por íons metálicos são conhecidos desde o início do século passado. A técnica de IMAC (*Immobilized Metal-Ion Affinity Chromatography*) baseia-se na afinidade diferencial que íons metálicos imobilizados em uma matriz sólida apresentam por certos grupamentos expostos na superfície de uma molécula em solução. Esta afinidade resulta de ligações de coordenação reversíveis formadas entre um íon metálico quelatado e certos resíduos de aminoácidos, tais como imidazol da

histidina. Com o advento da tecnologia do DNA recombinante, foi possível a incorporação de caudas (*tag*) em proteínas que não contêm naturalmente espécies doadoras de elétrons, tal como a fusão de sequência de seis histidinas na porção C ou N-terminal da proteína alvo, conferindo à mesma a possibilidade de purificação por IMAC. Proteínas com cauda de polihistidinas possuem afinidade a metais como o Ni^{2+} e o Co^{2+} imobilizados na resina, o que facilita a purificação da proteína alvo. Além disso, a cauda é pouco imunogênica e raramente interfere na estrutura e função da proteína (BRESOLIN, MIRANDA, BUENO, 2009).

As proteínas são introduzidas na fase móvel e adsorvidas principalmente pela formação de ligações de coordenação com sítios remanescentes dos íons metálicos quelatados. As moléculas adsorvidas podem ser eluídas por competição com outras espécies doadoras de elétrons como, por exemplo, o imidazol. O imidazol é utilizado na etapa de eluição, no qual um excesso deste composto é aplicado na coluna, competindo pela ligação com o metal através de coordenação química, liberando assim as proteínas (BRESOLIN, MIRANDA, BUENO, 2009).

De modo geral, qualquer íon metálico que apresente a capacidade de interagir com proteínas pode ser utilizado em IMAC. Os íons metálicos Ni^{2+} e Co^{2+} são utilizados na purificação de proteínas que possuam resíduos de histidina, na qual os íons metálicos interagem com o nitrogênio aromático do grupamento imidazol (SULKOWSKI, 1989).

Em alguns estudos, há relatos de que o processo de purificação da rhBMP-2 envolveu várias etapas para se obter uma proteína com grau maior de purificação, além de baixo rendimento global e utilização de reagentes caros para renovelamento da proteína, que se encontrava em corpos de inclusão (LONG et al., 2006; ZHANG et al., 2011).

Sabe-se que os custos que envolvem o processo de purificação de proteínas representam uma porcentagem significativa do custo total da produção. No entanto, a otimização do processo através da utilização e ajuste de meios adequados se faz necessário para a viabilidade da produção da proteína alvo. Além do mais, encontrar um sistema de purificação que resulte em entrega da proteína com grau elevado de pureza é de grande interesse, uma vez que essas proteínas podem ser utilizadas pela medicina regenerativa para introdução em suportes que induzam a proliferação de células e tecidos.

2.8 BIOPOLÍMEROS E MEDICINA REGENERATIVA

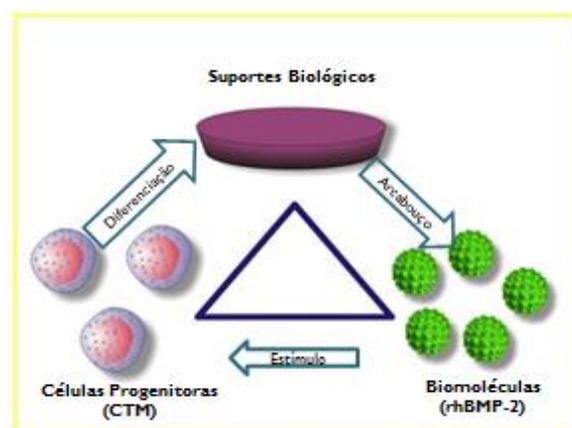
O auto-enxerto é considerado ideal para procedimentos de enxerto, fornecendo fatores de crescimento osteoindutivos, células osteogênicas e um suporte osteocondutor. Contudo,

existem limitações quanto à morbidade e disponibilidade de enxerto do doador. O aloenxerto, por outro lado, possui o risco de transmissão de doenças. Substitutos de enxerto sintéticos não possuem propriedades osteoindutivas ou osteogênicas. Enxertos compostos combinam propriedades de suportes com elementos biológicos para estimular a proliferação e diferenciação celular e, finalmente, a osteogênese (GIANNOUDIS et al., 2005).

O campo da Engenharia de Tecidos surgiu como consequência da combinação dos princípios de Engenharia, Química e Ciências Biológicas para o desenvolvimento de substitutos naturais que permitissem restaurar, manter ou melhorar a função dos tecidos. As estratégias da Engenharia de Tecidos envolvem o uso de células isoladas para substituir funções específicas e substâncias que induzem a proliferação de células e tecidos (fatores de crescimento), ambas combinadas a matrizes, que atuam como suportes (carreadores) para células e proteínas. Para que ocorra tal reparação, é fundamental a utilização de um arcabouço osteocondutor, para adesão e funcionamento das células osteoprogenitoras, bem como o uso de fatores de crescimento osteoindutores. Os fatores osteoindutores são caracterizados pela sua habilidade em promover a formação óssea, a maioria desses fatores são citocinas, as quais são proteínas extracelulares responsáveis pela sinalização celular, como por exemplo, as BMPs, (VALENZUELA, 2008).

Os transportadores de BMPs são de extrema necessidade pra aumentar a retenção na área de tratamento durante um período de tempo adequado para permitir que as células formadoras de tecido regenerativo migrem para a área lesionada, a fim de garantir a proliferação e diferenciação celular (BEGAM et al., 2016).

Figura 11. Tríade da medicina regenerativa. Suportes biológicos atuam como arcabouços para biomoléculas, que estimulam células tronco a se diferenciarem.



Fonte: <http://www.institutomor.com.br> em 20/05/2017, modificado.

Os requisitos essenciais para transportadores ideais para BMPs são (BEGAM et al., 2016):

- Capacidade de incitar as melhores respostas inflamatórias possíveis;
- Construção de uma interface com o tecido biológico adjacente;
- Porosidade ideal para permitir primeiro a infiltração das células e depois o crescimento vascular;
- Resistência adequada à compressão e à tração;
- Biodegradabilidade, embora permita a proteção das BMPs contra a degradação durante um período suficiente para estimular uma quantidade específica de massa óssea na área de tratamento;
- Atoxicidade, esterilidade, imunologicamente inerte e de fácil utilização;
- Facilidade de fabricação, com baixo custo e produção em larga escala;
- Provisão para liberação contínua de fatores incorporados e taxa de liberação para ser otimamente controlada devido à sua meia-vida curta *in vivo*.

Durante as últimas décadas, tem havido um interesse crescente na concepção e utilização de biomateriais ósseos *in vitro* e *in vivo*. Muitos investigadores têm pesquisado vários biomateriais para a formação óssea, tais como, colágeno derivado do osso, matriz óssea descalcificada, fibrina, composto de nano-hidroxiapatita/colágeno (nHAC), poli (ácido glicólico-co-láctico) sintético e titânio para a reparação de defeitos ósseos (NIU et al., 2009).

Os polímeros naturais, como colágeno, quitosana e ácido hialurônico, permitiram adesão, disseminação e diferenciação celular aplicando-os como sistemas primários de entrega de BMPs. As vantagens do colágeno (ampla disponibilidade, biodegradabilidade completa, biocompatibilidade e bom desempenho para o reparo ósseo *in vivo*) devem ser equilibradas por suas desvantagens: risco potencial de transmissão de patógenos (origem xenogênica) e falta de resultados de reprodutibilidade devido à rápida degradação *in vivo*. Por outro lado, foram avaliados os polímeros sintéticos, como o ácido poliláctico (PLA), o ácido poliglicólico (PLG) e os hidrogéis, pois apresentam propriedades físico-químicas controláveis e não possuem riscos de contaminação patogênica. No entanto, a reação inflamatória tem sido associada à sua biodegradação. As associações entre polímeros naturais e sintéticos também estão em análise intensa, com resultados promissores (CARREIRA et al., 2014).

O plasma rico em plaquetas (PRP) também é utilizado para reparar defeitos ósseos, pois contém fatores de crescimento que podem promover a diferenciação celular e cicatrização no local da lesão, acelerando a reparação (LIM et al., 2013). O ácido poliláctico

(PLA) é atualmente o material sintético mais investigado e utilizado devido à sua biodegradabilidade e biocompatibilidade (SHUE et al., 2012). O poli (ácido L-láctico) (PLLA) é um biomaterial não tóxico e degradável que tem sido amplamente utilizado como *scaffold* em engenharia de tecido ósseo. O composto nHAC/PLLA mostrou melhora na ligação celular e no estímulo da proliferação e diferenciação celular devido à sua composição principal e à microestrutura hierárquica que se assemelham bastante ao do osso natural (NIU et al., 2009).

Entre os biomateriais com potencial aplicação para engenharia de tecidos pode-se destacar a celulose. A celulose é um polímero natural e hidrofílico biocompatível composto exclusivamente por monômeros de glicose e possui boas propriedades mecânicas (KLEMM 2005; GANDINI 2011). Sua degradação extremamente lenta dentro do corpo humano representa uma limitação severa para aplicações biomédicas mais complexas. Recentemente, a nanofibra de celulose (NFC) atraiu muita atenção devido a sua alta afinidade pela água e sua capacidade de formar dispersões altamente viscosas com muito baixo teor de sólidos. A NFC mostra ser uma promessa devido à sua estrutura bem definida e a possibilidade de comportar-se como um hidrogel (BHATTACHARYA 2012; LIN 2014). Um dos métodos de preparo de nanofibras de celulose é através da oxidação mediada por N-oxil-2,2,6,6-tetrametilpiperidina (TEMPO) que gera um derivado carboxilado de celulose (ToNFC) com maior solubilidade em água devido ao alto grau de substituição com grupos carboxílicos (cerca de 90%). O que torna a ToNFC interessante é que os seus derivados são carboxilados, com estruturas semelhantes à carboximetilcelulose, os quais podem desintegrar-se em ambiente fisiológicos. Em pH fisiológico (~7,4), cerca de 90% da celulose oxidada é solubilizada dentro de 21 dias e convertida no sal de sódio do ácido poliglucurônico que é então facilmente eliminado do corpo (SINGH, 1982).

Desta forma, aspectos importantes da utilização de proteínas recombinantes humana associadas a sistemas carreadores necessitam de maiores estudos a fim de se encontrar um sistema apropriado que garanta um protocolo de tratamento mais adequado para a utilização da técnica no reparo ósseo.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho foi a obtenção da rhBMP-2 na forma solúvel e biologicamente ativa, por meio do sistema de expressão bacteriano, para posterior utilização na imobilização em suportes biológicos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Testar as linhagens de *E.coli* BL21 (DE3) e Rosetta (DE3) pLysS para comparação da melhor expressão da rhBMP-2 na forma solúvel;
- Determinar as melhores condições de cultivo para a produção da rhBMP-2;
- Comparar, otimizar e padronizar as condições de purificação da rhBMP-2 utilizando cromatografia de afinidade em colunas de níquel e cobalto;
- Testar a atividade biológica por meio de ensaio de proliferação e viabilidade celular, utilizando CTM e células pré mioblásticas C2C12 de ratos;
- Realizar ensaio de atividade biológica com a imobilização da rhBMP-2 em celulose modificada com um grupamento maleimida (ToNFC-maleimida).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 CLONAGEM DO GENE DA BMP-2 NO PLASMÍDEO

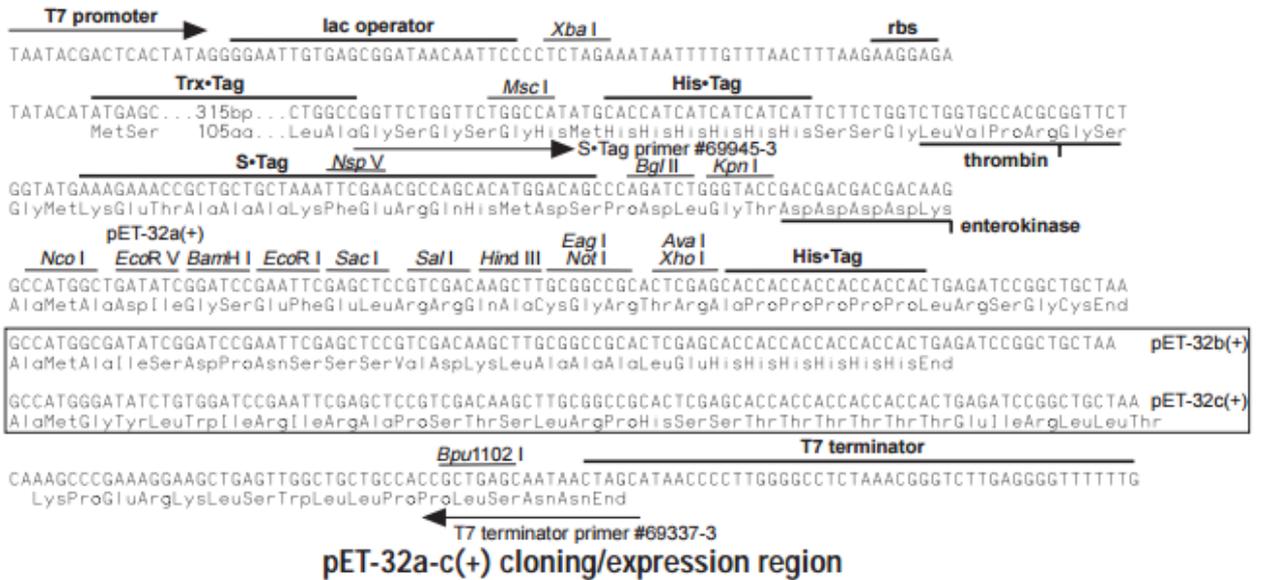
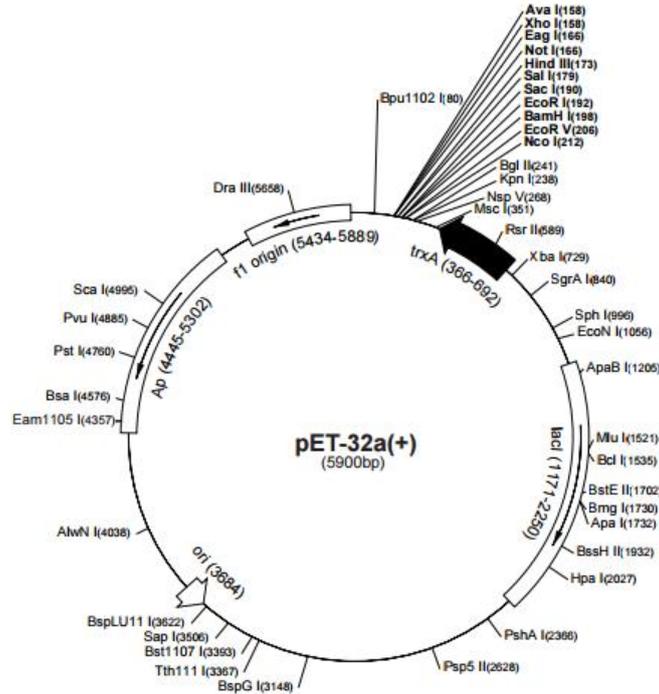
A clonagem do gene que codifica a BMP-2 foi previamente realizada no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular do Departamento de Ciências Fisiológicas da UFSCar, em colaboração com a Profa Dra Heloísa Sobreiro Selistre de Araújo.

O vetor de expressão pET-32a(+) (Novagem, Madison, WI, USA (Fig. 12), foi utilizado para a clonagem do gene de interesse, sob controle do promotor *lac Z*. Este vetor permite a expressão da proteína em fusão com a proteína tiorredoxina (Trx.Tag), a qual facilita a expressão solúvel da proteína, e em fusão com um peptídeo N-terminal contendo a sequência de 6 resíduos de histidinas (6xHis-TagTM), que exerce afinidade pelos metais utilizados em etapa posterior na purificação por cromatografia de afinidade.

O gene (ORF) que codifica a BMP-2 de humano foi obtido pela reação de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) utilizando como DNA molde o DNA genômico de células de osteossarcoma humano (MG63). Os oligonucleotídeos iniciadores (primers) sense (5') e antisense (3') foram sintetizados, tendo sua sequência baseada na ORF do exon 3 do gene da BMP-2 de humano (UniProtKB/Swiss-Prot, P12643). A proteína madura possui 113 aminoácidos e aproximadamente 12,4 kDa que, juntamente com a proteína de fusão, terá um peso molecular de aproximadamente 24kDa.

O plasmídeo obtido da subclonagem foi denominado rhBMP-2/32 e introduzido em células de *E.coli* DH5 α para propagação.

Figura 12. Vetor de clonagem pET-32a(+).



4.2 PREPARO DE CÉLULAS COMPETENTES

Uma bactéria torna-se competente quando está apta a receber o DNA exógeno. A competência de células pode ser produzida através do tratamento com solução de CaCl_2 associado à mudanças bruscas de temperatura, o que altera a permeabilidade da membrana celular, fazendo com que as células permitam a entrada do DNA exógeno através da membrana plasmática.

Para verificar a expressão e produção da rhBMP-2 foram utilizadas duas linhagens de *E.coli*, BL21(DE3) e Rosetta (DE3) pLysS. O procedimento descrito a seguir foi utilizado para ambas as linhagens. Em um tubo falcon com capacidade de 50ml, foram adicionados 10ml de meio LB (Luria Bertani), em BL21(DE3) seguida, com o auxílio de uma alça microbiológica, transferiu-se uma colônia de *E. coli* ao meio. O tubo foi então encubado a 37°C sob agitação (250 rpm) até atingir a $\text{D.O}_{660\text{nm}} = 0.6$. A leitura foi realizada em espectrofotômetro. O inóculo foi centrifugado, o sobrenadante descartado e o precipitado celular foi ressuscitado em solução gelada de CaCl_2 100 mM estéril. A suspensão celular foi mantida no gelo por 20 minutos e após esse período as células foram centrifugadas por 5 minutos sob a mesma condição (4°C , 3000 rpm) e desprezado o sobrenadante. O precipitado foi ressuscitado novamente em solução CaCl_2 100 mM, obtendo-se finalmente células competentes que foram mantidas no gelo até a utilização para reação de transformação

4.3 TRANSFORMAÇÃO DE CÉLULAS COMPETENTES

Após a preparação um volume de 50 μl de células competentes foram incubadas com o DNA plasmidial rhBMP-2/32 (3 μl). Em seguida, as células com o DNA foram incubadas no gelo por 30 minutos e submetidas a choque térmico em banho maria por 2 minutos a 42°C , retornando ao gelo por mais 2 minutos. Ao microtubo, foram adicionados 200 μl de LB (4 vezes o volume de células competentes) e a suspensão celular foi incubada por 1 hora a 37°C sob agitação (250 rpm). Após a incubação, 50 μl da cultura foram semeadas em placa de petri contendo meio sólido LB suplementado com ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$). A placa semeada foi então incubada por um período de 16 horas em estufa microbiológica a 37°C . Esta etapa foi realizada previamente com células competentes de *E. coli* BL21(DE3) e posteriormente repetida utilizando-se células competentes de *E.coli* Rosetta (DE3) pLysS.

4.4 EXPRESSÃO DA rhBMP-2

Para expressão da proteína recombinante, nas duas linhagens de *E. coli* utilizou-se o mesmo protocolo. *E. coli* BL21(DE3) transformadas com o plasmídeo de interesse foram cultivadas em dois inóculos com 10 ml de meio LB estéril contendo 100 µg/mL de ampicilina. Em seguida, os dois inóculos foram mantidos sob agitação de 250 rpm a 37°C por 16 horas. Ao fim deste período, cada cultura foi diluída em um frasco erlenmeyer contendo 250 ml de meio LB com antibiótico. Após a diluição as culturas foram mantidas na mesma condição citada acima até atingirem a $D.O_{660nm} \approx 0.6$ a 0.7.

Após atingirem a D.O adequada, retirou-se uma alíquota de 1 ml de cada uma das culturas (T0 = tempo zero, antes da indução) que foram centrifugadas por 5 minutos à 13.000 rpm. Em seguida o precipitado celular foi ressuscitado em 50 µl de água autoclavada, adicionados 25 µl do tampão da amostra contendo β-mercaptoetanol e as amostras foram reservadas para posterior análise em eletroforese de gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). A uma das culturas, foi então adicionada 1 mM de IPTG (isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo) e mantida a 20°C por 16 horas sob agitação de 250 rpm. À outra cultura, foi também adicionada IPTG na mesma concentração e mantido a 37°C por 3 horas sob agitação de 250 rpm. Após o período de indução retirou-se uma alíquota de 1 ml de cada uma das culturas (T3, T16 = três e dezesseis horas após a indução, respectivamente), que foram centrifugadas a 13000 rpm por 5 minutos. Os sobrenadantes foram então descartados e os precipitados ressuscitados com 50 µl de água autoclavada e 25 µl de tampão da amostra contendo β-mercaptoetanol. As amostras foram também reservadas para análise por SDS-PAGE. Posteriormente, culturas foram centrifugadas a 5.000 rpm por 20 minutos a 4°C (Sorvall® RC 5C Plus). Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o precipitado celular mantido a 20°C até a etapa de lise celular pelo método de rompimento por sonicação.

Para realização da lise celular, o precipitado foi ressuscitado em 12,5 ml de tampão A (Imidazol 5mM, NaCl 0,5M, Tris 20 mM, pH 7.9) e submetido à sonicação. Foram realizados 6 pulsos de 1 minuto com intervalo de 30 segundos entre os pulsos, com amplitude de 20%. O lisado celular foi centrifugado a 15.000 rpm por 20 minutos a 4°C. Uma alíquota da fração solúvel (sobrenadante) e da fração insolúvel (precipitado celular) foi retirada e tratada com tampão da amostra para análise por SDS-PAGE.

Com o propósito de analisar qual linhagem bacteriana promoveria melhor expressão da proteína alvo, para fins comparativos, o processo foi repetido posteriormente utilizando-se *E. coli* Rosetta (DE3) pLysS submetida à expressão sob temperatura de 20°C por 16 horas e

agitação de 250 rpm, visto que, de acordo com resultados prévios analisados na expressão utilizando *E. coli* BL21 (DE3), esta temperatura favoreceu a expressão da proteína. A lise celular da cultura de *E. coli* Rosetta (DE3) pLysS foi realizada como descrita anteriormente, porém utilizando tampão PBS 1X, tampão este utilizado também em etapa de otimização da purificação.

4.5 PURIFICAÇÃO DA rhBMP-2

As frações solúveis contendo a proteína recombinante foram purificadas por cromatografia de afinidade (IMAC), utilizando resinas contendo Ni²⁺ (níquel) e Co²⁺ (cobalto) para verificarmos qual delas permite uma melhor purificação parcial. Previamente, a purificação foi realizada a partir do sobrenadante de rhBMP-2 obtidas através da expressão em *E. coli* BL21 (DE3) sob determinadas condições e, posteriormente, testadas outras condições com a finalidade de otimizar o processo.

Inicialmente, as colunas contendo as resinas foram lavadas com 20 CV (volume da coluna) de água *Milli-Q* e equilibrada com 10 CV de tampão A (imidazol 5 mM, NaCl 0,5 M, Tris 20 mM, pH 7.9). Um volume de 5 ml da fração solúvel foi aplicado e a resina, ressuspendida. Depois que a resina foi sedimentada novamente, foram recolhidas as frações das proteínas não ligantes (void). Em seguida foi realizada a lavagem com 20 CV de tampão A e a eluição das proteínas foi realizada pela adição de 2 CV de Tampão B (tampão A acrescido com diferentes concentrações de imidazol: 50 mM, 150 mM, 250 mM e 500 mM). Para cada concentração de Imidazol foram coletadas frações de 0,5 ml. De cada fração retirou-se uma alíquota de 10 µl onde foram adicionados 5 µl de tampão da amostra contendo β-mercaptoetanol, para posterior análise por SDS-PAGE.

Para a otimização da purificação alguns ajustes foram realizados com a finalidade de obtenção de uma proteína com grau de pureza maior. No entanto, adotou-se o uso de um volume maior de resina, que passou de 1 ml para 3 ml, com o intuito de aumentar a retenção de proteínas. O tampão de equilíbrio (A) foi substituído, primeiramente por PBS 1x, posteriormente por PBS 1x + imidazol 25 mM e, finalmente, por PBS 1x + imidazol 10 mM. Na tentativa de reter a menor quantidade de resíduos na coluna, foi padronizada em três vezes as etapas de lavagens com o tampão de equilíbrio, após a aplicação da proteína. As eluições adotadas para as próximas purificações continuaram sendo compostas pelo referido tampão B, porém apenas nas concentrações de imidazol a 250 mM e 500 mM.

Após a etapa cromatográfica, as frações contendo a rhBMP-2 parcialmente purificadas foram dialisadas contra tampão PBS 1X para retirada do imidazol e a concentração da proteína foi determinada pelo método de BCA (Ácido Bicinconínico) de acordo com o manual do kit do fabricante.

4.6 ENSAIO DE IMUNODETECÇÃO

Após a visualização da banda de tamanho de 24 kDa correspondente a rhBMP-2 associado à tiorredoxina e a cauda de histidina, foi realizado ensaio de imunodeteção com a finalidade de confirmar a produção da rhBMP-2 em fusão N-terminal com a proteína tiorredoxina, juntamente com 6 resíduos de histidina (6x His-TagTM). As amostras foram separadas por SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 15% e eletrotransferidas para membrana de nitrocelulose pelo sistema de transferência semi seco (Transblot SD Semi-Dry Transfer Cell Bio- Rad). Em seguida, a membrana foi submetida a bloqueio de sítios inespecíficos em tampão TBS 1X (Tris-HCl 100 mM pH 7,5, NaCl 150 mM) com 5% de leite desnatado, por um período de 16 horas a 4°C. Após o bloqueio a membrana foi lavada três vezes por 5 minutos, sob agitação suave, com TBS 1x contendo TWEEN-20 0,05%. Depois de lavada a membrana foi incubada com anticorpo conjugado monoclonal anti poli histidina 1: 2000 (*Anti-poly Histidine – Alkaline-Phosphatase, anti-mouse* -Sigma-Aldrich) por 2 horas. Posteriormente, a membrana foi novamente lavada três vezes e a revelação foi realizada incubando-se a membrana em tampão para fosfatase alcalina (*AP-buffer*: Tris-HCl 0,1 M pH 9,5, NaCl 0,1M, MgCl₂ 5 mM) contendo substrato BCIP / NBT (5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato / nitro azul tetrazólio). A reação foi interrompida pela lavagem com água pura (Sistema Milli-Q).

4.7 ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO E VIABILIDADE CELULAR

Para avaliar a atividade biológica da rhBMP-2, foi realizado o ensaio de proliferação celular pelo método de MTT (*3-[4,5-Dimethylthiazol-2yl]-2,5- diphenyltetrazolium bromide; Thiazolyl blue*). O método de MTT detecta o crescimento celular por meio da função mitocondrial, ou seja, baseia-se na habilidade da enzima mitocondrial desidrogenase, encontrada somente em células viáveis, em clivar os anéis de tetrazólio do MTT, formando cristais azuis escuros de formazan, os quais são impermeáveis às membranas celulares,

ficando então retidos no interior das células viáveis. Os cristais são solubilizados em isopropanol e em seguida é realizada a leitura da absorbância. O número de células viáveis é diretamente proporcional ao nível de cristais de azul de formazan solubilizados. Para os experimentos com a rhBMP-2 foram utilizadas 2 linhagens celulares, células tronco mesenquimais (CTMs) de ratos e C2C12 (ATCC® CRL-1772™). A linha celular C2C12 é um subclone da linha celular mioblástica de rato e diferencia-se rapidamente, formando miotubos contrácteis e produzindo proteínas musculares características. O tratamento com a rhBMP-2 causa uma mudança na via de diferenciação de mioblasto para osteoblasto (KATAGIRI et al., 1994).

As CTMs foram extraídas da medula óssea de fêmur de rato, pela Prof^a Dra Mônica Rosas da Costa Iemma e pela técnica do laboratório LECER, Renata Aquino. Os animais utilizados para a obtenção dessa linhagem foram gentilmente doados pelo Prof Dr Nivaldo Parizotto, do PPGb-UNIARA. O cultivo das células foi realizado em meio α -MEM (*Minimum Essential Medium Eagle Alpha Modification*), suplementado com 10% de FBS. Após a terceira passagem, as células foram semeadas na placa de 96 poços na concentração de 1×10^3 células/poço em quadruplicata, e mantidas em estufa a 37°C em contendo α -MEM 10% de FBS. O tempo de incubação com a rhBMP-2 nesta cultura foi de 4 dias. O meio de cultura foi removido e aos poços foi adicionado um volume de 50 μ l de solução MTT (5mg/ml em PBS1X), a placa foi incubada por 4 horas em estufa a 37°C. Após o período de incubação a solução com MTT foi removida e adicionado um volume de 100 μ l de isopropanol para solubilização dos cristais de formazan. A absorbância foi verificada em leitor de placa Spectra Max i3 (Molecular Devices) no comprimento de onda de 570 nm. Os resultados desse único experimento foram apresentados em gráfico de barras utilizando programa Excel.

Para o ensaio com as células C2C12 o protocolo foi diferente, as células foram semeadas em placa de 96 poços na concentração de 5×10^3 células/poço em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) suplementado com 10% FBS e mantidas em estufa a 37°C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ por 24 horas. Após o cultivo de 24 horas o meio de cultura foi removido e foi adicionado um volume de 100 μ l de meio DMEM contendo 0,5% de FBS com ou sem rhBMP-2 (0,15 μ g, 0,3 μ g, 0,5 μ g e 150 μ g/poço), além de um controle positivo contendo 10% de FBS. O tempo de incubação com a rhBMP-2 foi de 24 horas. Este protocolo foi disponibilizado pela doutoranda Taís Marolato Danilucci, do LBBM- DCF/ UFSCar. Após a incubação com a rhBMP-2 ou não, foi adicionado em cada poço 20 μ l de solução MTT e a placa foi incubada por 3 horas e meia a 37°C. Em seguida o meio foi removido e um volume de 100 μ l de isopropanol foi adicionado. A placa ficou sob

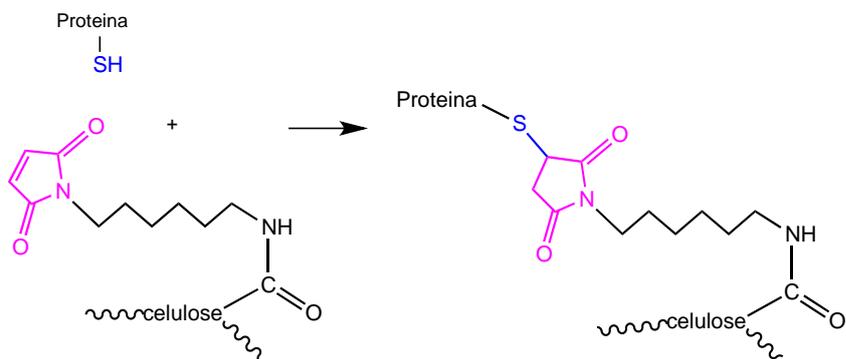
suave agitação por 10 minutos e em seguida com a micropipeta fez-se a solubilização dos cristais de formazan. A absorbância foi verificada em leitor de placa Spectra Max i3 (Molecular Devices) no comprimento de onda de 570 nm. Este experimento foi repetido duas vezes. Os valores obtidos da absorbância foram mostrados em gráfico de barras utilizando o programa Graph Pad Prisma. Para análise estatística dos dados foi utilizado o teste One Way Anova com a correção de Bonferroni (Bonferroni's Multiple Comparison Test). Valores de $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

4.8 ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR UTILIZANDO A rhBMP-2 IMOBILIZADA NA SUPERFÍCIE DE CELULOSE MODIFICADA

A celulose quimicamente modificada com o grupamento químico maleimida e ligada com a rhBMP-2 utilizada neste experimento foi cedida pela Prof Dra Eliane Trovatti do PPGb/UNIARA pertencente ao grupo BiopolMat. A celulose foi obtida em experimento descrito detalhadamente segundo estudo publicado (TROVATTI et al., 2016). A rhBMP-2 foi imobilizada na superfície da ToNFC-maleimida através da ligação do enxofre (SH) contido na tiorredoxina fusionada na rhBMP-2 com a ligação dupla da maleimida, conforme representado na Figura 13.

Para os experimentos de proliferação e viabilidade celular, foi utilizada células C2C12 seguindo o protocolo descrito anteriormente no item 4.7, com pequenas modificações. Inicialmente o fundo dos poços de uma placa de 96 poços foram preenchidos com celulose modificada e tratada ou não com a rhBMP-2. Em seguida a placa ficou sob radiação da luz UV em fluxo laminar por 30 minutos para a esterilização da celulose. Após a irradiação foram semeadas 5×10^3 células/poço/100 μ l, em meio cultura DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) acrescido com penicilina e estreptomicina 10U/mL, suplementado com 0,5% de FBS e mantidas em estufa a 37°C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ por 24 horas. Após o período de incubação, foi adicionado aos poços 20 μ l de solução MTT 5 mg/ml em PBS1X em cada poço e a placa foi incubada por 4 horas em estufa a 37°C. Após o período de incubação com o MTT o meio foi removido e foi adicionado um volume de 100 μ l de isopropanol, a placa foi agitada por 10 minutos e em seguida foi realizada a ressuspensão com a micropipeta para solubilização dos cristais de formazan. Cada ressuspensão foi transferida em um volume de 50 μ l para outro poço e, então, a absorbância foi verificada em leitor de placa Spectra Max i3 (Molecular Devices) no comprimento de onda de 570 nm.

Figura 13. Reação do enxofre (SH) com a ligação dupla da maleimida.



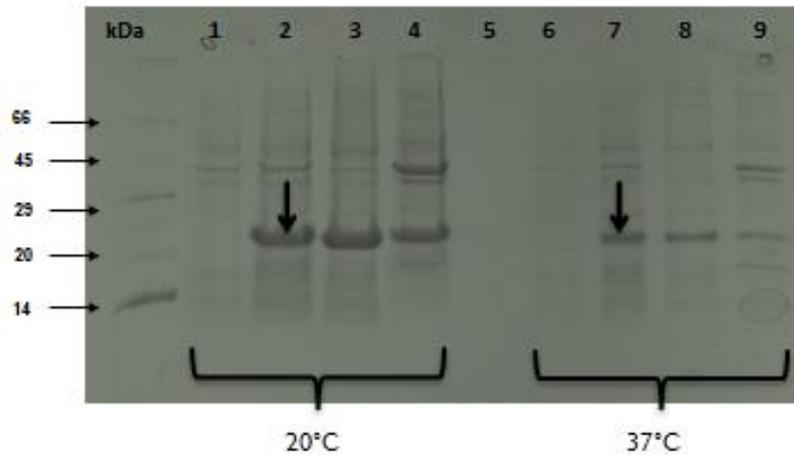
Fonte:Trovatti et al, 2016

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

EXPRESSÃO DA rhBMP-2

A rhBMP-2 está apta para uso quando expressa na forma solúvel, formando dímeros através de ligações dissulfeto intercadeias e, conseqüentemente possuindo atividade biológica. As principais desvantagens no uso de *E.coli* como sistema de expressão incluem a inabilidade da bactéria em realizar modificações pós-traducionais que ocorrem em eucariotos, a ausência de um mecanismo de secreção da proteína alvo para o meio de cultura, o que acarreta sua produção na forma insolúvel na forma de corpos de inclusão e a limitada habilidade de promover a formação de pontes dissulfeto, essenciais para a atividade biológica da proteína (GOPAL, 2013). A maioria dos estudos (LONG et al., 2005; SHARAPOVA et al., 2010; ZHANG et al., 2011; RETNONINGRUM, et al., 2012) relatam a produção de rhBMP-2 na forma insolúvel, sendo necessário o processo de *refolding* para tornar a proteína biologicamente ativa, o que poderia gerar maior gasto, além de menor rendimento do produto. Estudos que visem a produção da rhBMP- 2 buscam resultados que otimizem a produção dessas proteínas e as torne acessível à população. Contudo, em nosso trabalho, utilizamos um método no qual conseguimos expressar a rhBMP-2 na forma solúvel, ou seja, sem a necessidade de *refolding*, traduzindo-se em um método econômico de obtenção da proteína. Neste trabalho, foi utilizado o plasmídeo pET-32a(+), que permite a expressão da proteína em fusão com a tiorredoxina (Trx.Tag), a qual facilita a expressão solúvel da proteína alvo. Para a expressão da rhBMP-2, inicialmente, foi utilizada a linhagem de *E.coli* BL21(DE3), especificamente construída para transformação e expressão em níveis elevados de proteínas recombinantes, sob controle do *operon lac*. De acordo com os resultados, analisados por SDS-PAGE, as condições de expressão e lise possibilitaram a produção da proteína de interesse, que foi obtida preferencialmente à 20°C e em maior proporção na forma solúvel, após indução com IPTG 1mM por 16 horas (Fig. 14). Uma análise por SDS-PAGE das proteínas intracelulares totais mostrou a presença de uma banda de proteína de aproximadamente 24 kDa, que se assemelha ao tamanho da rhBMP-2 em fusão com tiorredoxina adicional e 6 x His-TagTM.

Figura 14. SDS-PAGE: Expressão e Solubilidade da rhBMP-2 produzida em *E. coli* BL21(DE3) BMP-2/32. As culturas celulares (250ml) foram induzidas com 1mM de IPTG por 16 horas e 3 horas, a 20 e 37°C ambas sob agitação (250rpm). Após a indução as culturas foram centrifugadas, ressuspendidas em tampão binding buffer 1X e lisadas por meio de sonicação. O lisado celular foi centrifugado para a obtenção das frações solúvel e insolúvel **kDa**-padrão de peso molecular (66-45-29-20-14); **Poços 1 e 2:** Conteúdo proteico antes e depois da indução a 20°C respectivamente; **Poços 3 e 4:** Conteúdo proteico da fração solúvel e insolúvel respectivamente. **Poços 6 e 7:** Conteúdo proteico antes e depois da indução a 37°C. **Poços 8 e 9:** Conteúdo proteico da fração solúvel e insolúvel respectivamente.



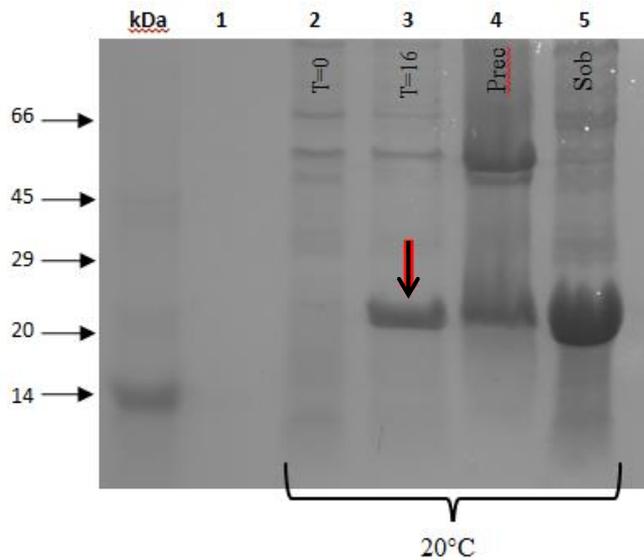
Fonte: Próprio autor.

O sucesso na expressão de proteínas eucarióticas utilizando-se sistema procarioto depende de diversos fatores como a concentração do indutor, a temperatura de expressão, o vetor utilizado e a linhagem bacteriana (GOPAL, 2013).

As condições de cultivo desempenham um papel chave no enovelamento das proteínas, ou seja, temperaturas mais baixas são normalmente mais eficazes do que temperaturas mais altas (CHEN, 2006). Desta forma, a diminuição da temperatura provavelmente permitiu que a proteína tivesse um tempo maior para alcançar suas estruturas terciárias e quaternárias, favorecendo o seu dobramento correto (SCHEUFLER et al., 1999).

De acordo com os resultados obtidos na expressão utilizando *E. coli*, BL21(DE3) e na tentativa de otimização da expressão da rhBMP-2 solúvel e com maior rendimento, o processo de expressão foi repetido utilizando *E. coli* Rosetta (DE3) pLysS, para efeito de comparação de eficácia. Porém, depois de constatado que a expressão em baixas temperaturas foi favorável à sua solubilidade, a expressão realizada com *E. coli* Rosetta (DE3) pLysS foi realizada apenas a 20°C, sob indução com IPTG por 16 horas (Fig. 15).

Figura 15. SDS-PAGE: Expressão e Solubilidade da rhBMP-2 produzida em *E. coli* Rosetta(DE3)pLysS BMP-2/32. A cultura celular (250ml) foi induzida com 1mM de IPTG por 16 horas a 20°C sob agitação (250rpm). Após a indução a cultura foi centrifugada, ressuspendida em tampão PBS 1X e lisada por meio de sonicação. O lisado celular foi centrifugado para a obtenção das frações solúvel e insolúvel. **kDa**-padrão de peso molecular (66-45-29-20-14); **Poços 2 e 3:** Conteúdo proteico antes e depois da indução a 20°C respectivamente; **Poços 4 e 5:** Conteúdo proteico da fração insolúvel (precipitado) e solúvel (sobrenadante), respectivamente.



Fonte: Próprio autor.

De acordo com os resultados da expressão realizada à 20°C e lise obtidas utilizando *E. coli* Rosetta (DE3) pLysS, analisados por SDS-PAGE (Fig.15), foi constatado um aumento na expressão da proteína na forma solúvel, quando comparados aos resultados obtidos na expressão realizada com *E. coli* BL21(DE3).

A linhagem Rosetta (DE3) pLysS é derivada da BL21 e tem a capacidade propiciar um aumento da expressão de proteínas eucarióticas que contém códons raros para *E.coli*. A suplementação de tRNAs para códons AGG/Arg, AGA/Arg, AUA/Ile, CUA/Leu, CCC/Pro, e GGA/Gly é fornecida pelo plasmídeo pLysS RARE, que permite a expressão de proteínas em cuja sequência codificante estes códons estejam presentes. Também é responsável por expressar a lisozima T7, um inibidor natural da T7 RNA polimerase. Esta inibição é importante em sistema pET pois suprime possíveis expressões basais, estabilizando assim os plasmídeos recombinantes que codificam proteínas prejudiciais ao crescimento celular e a sua viabilidade. Estes fatores podem ter contribuído para o maior rendimento da proteína obtida na forma solúvel (NOVAGEN, 2017).

O uso de *E. coli* como biofábrica apresenta várias vantagens que as tornam a principal fonte de proteínas recombinantes. Além de apresentar seu genoma conhecido, seu cultivo é facilmente mantido e economicamente viável para a produção em larga escala. Hoje estão

disponíveis vários sistemas de expressão e linhagens geneticamente modificadas desta bactéria, para suprir as diversas condições de expressão recombinante. Entretanto, fatores inerentes à fisiologia da *E. coli* como a limitada capacidade de realizar modificações pós traducionais, a falta de um mecanismo de secreção para a liberação da proteína no meio de cultura e a capacidade limitada para facilitar a formação de ligações dissulfeto, dificultam alguns processos necessários para a expressão, principalmente quando o objetivo é a expressão de proteínas eucarióticas, além de acarretar ausência de atividade biológica (WANG et al., 2005).

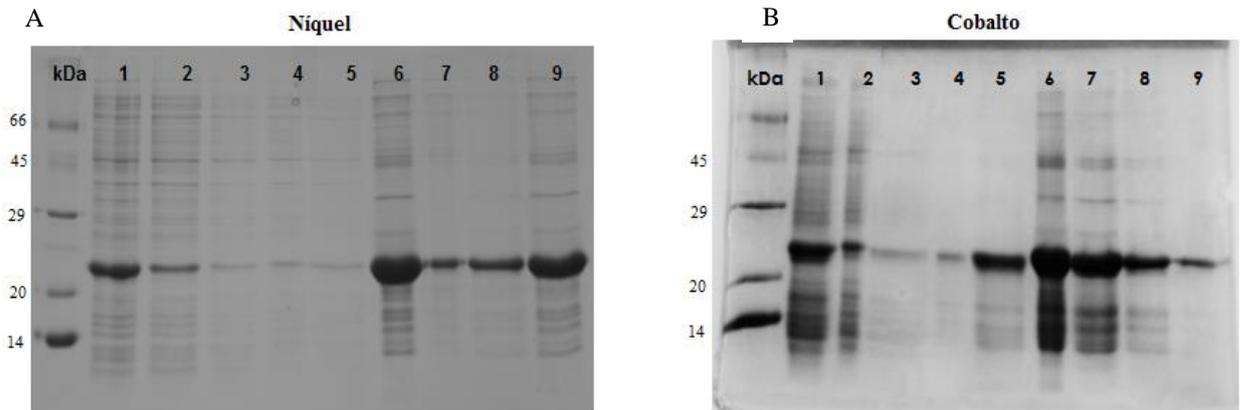
O plasmídeo pET-32a(+), escolhido como vetor de clonagem neste trabalho, permite fusão com a proteína tiorredoxina (TrxA). A TrxA possui 11,7 kD e é encontrada em bactérias, leveduras, plantas e mamíferos, e é caracterizada como um doador de hidrogênio para a ribonucleotídeo redutase, enzima essencial que proporciona desoxirribonucleotídeos para a replicação do DNA (HOLMGREN, 1989). Quando superexpressa em *E. coli*, a TrxA pode resultar em aumento da solubilidade da proteína. O sucesso com relação à solubilidade da rhBMP-2 neste trabalho, pode ser atribuído a este fator.

A otimização da produção de proteínas recombinantes baseia-se em protocolos adaptados para cada proteína. Fatores como o vetor de clonagem, as linhagens bacterianas e as condições de cultivo utilizados neste trabalho foram imprescindíveis para os resultados positivos obtidos na expressão da rhBMP-2. Neste sentido, é válido o estudo aprofundado da proteína alvo, a fim de se encontrar os melhores parâmetros para a sua produção.

PURIFICAÇÃO DA rhBMP-2

A purificação da BL21(DE3) BMP-2/32 realizada em coluna contendo resina de cobalto resultou em frações com menor presença de contaminantes (Fig 16.B) quando comparados a frações obtidas na mesma condição purificadas em coluna contendo resina de níquel (Fig 16.A), porém, os resultados foram bastante comparativos. Além do mais, observou-se que eluições à 250 mM e 500 mM de imidazol garantiram maior vantagem com relação às outras eluições, visto que essas concentrações permitiram a obtenção de uma proteína contendo menos resíduos e em quantidade considerável.

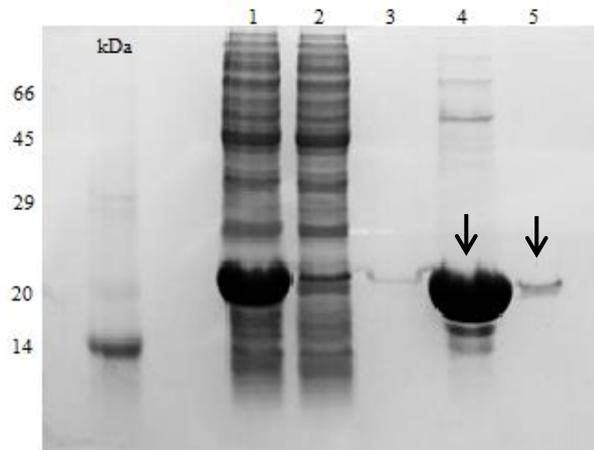
Figura 16. SDS-PAGE: Purificação da rhBMP-2 produzida em *E. coli* BL21(DE3) BMP-2/32 (\cong 24KDa) por cromatografia de afinidade em coluna com resina de níquel (A) e cobalto (B), respectivamente, pré equilibrada com tampão A. A eluição foi realizada com diferentes concentrações Imidazol (Tampão A + Imidazol, 50-250mM). kDa-padrão de peso molecular (66-45-29-20-14); **Poço 1: Fração solúvel (pré coluna); **Poço 2:** proteínas não ligantes (Void); **Poço 3:** lavagem; **Poços 4 e 5:** frações eluídas com 50mM de Imidazol, ; **Poços 6 e 7:** frações eluídas com 150mM de imidazol; **Poços 8 e 9:** frações eluídas com 250mM de imidazol.**



Fonte: Próprio autor.

A partir dos resultados demonstrados anteriormente (Fig. 16) e com o intuito de se obter uma proteína recombinante com grau de pureza satisfatório para os ensaios biológicos, algumas alterações foram realizadas para as purificações posteriores. O processo de purificação foi prosseguido em coluna contendo níquel, pois tanto coluna contendo níquel como cobalto permitiram resultados comparáveis de uma proteína parcialmente purificada. O volume da resina passou de 1 ml para 3 ml, visando reter mais proteína imobilizada na coluna. De acordo com os dados da etapa anterior, foram adotados apenas eluições de 250 mM e 500 mM de imidazol, as quais apresentaram um grau maior de pureza da proteína associado a um rendimento considerável. Na tentativa de reter menos impurezas ligadas à resina, foi padronizado três lavagens e o tampão de equilíbrio utilizado nesta etapa, antes da aplicação das eluições, foi o PBS 1x.

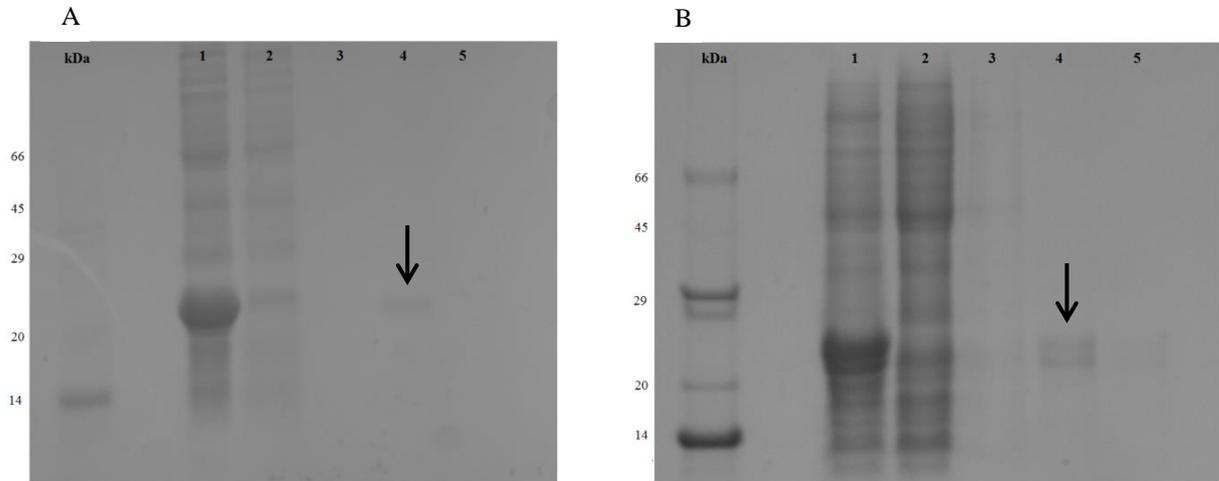
Figura 17. SDS-PAGE: Purificação da rhBMP-2 produzida em *E. coli* Rosetta (DE3) pLysS BMP-2/32 (\cong 24KDa) por cromatografia de afinidade em coluna com resina de níquel pré equilibrada com tampão PBS 1x. A eluição foi realizada com diferentes concentrações Imidazol (Tampão PBS + Imidazol, 250mM e 500mM). kDa-padrão de peso molecular (66-45-29-20-14); **Poço 1: Fração solúvel (pré coluna); **Poço 2:** proteínas não ligantes (Void); **Poço 3:** lavagem; **Poço 4:** fração eluída com 250mM de Imidazol, ; **Poço 5:** fração eluída com 500mM de imidazol.**



Fonte: Próprio autor.

Os resultados obtidos na purificação anterior (Fig.17) mostraram que a proteína purificada ainda apresentava uma quantidade considerável de contaminantes. No entanto, novas adaptações foram realizadas na tentativa de reduzir ainda mais a proporção desses contaminantes. Nesse sentido, foi realizada adição de imidazol ao tampão de equilíbrio PBS 1x para que proteínas fracamente ligadas se desligassem da coluna. Ao tampão de equilíbrio PBS (1x) foi adicionado, primeiramente 25 mM de imidazol, o que acabou acarretando despreendimento demasiado da proteína de interesse e, conseqüentemente, perda desta em grande proporção (Fig 18. A). No entanto, na tentativa de aumentar a quantidade de proteína obtida, porém, com menos contaminantes, a concentração de imidazol no tampão de equilíbrio PBS 1x foi reduzida à 10mM. Através dos resultados analisados por SDS-PAGE, a fração de rhBMP-2 purificada em coluna equilibrada com tampão PBS 1x adicionado à 10 mM de imidazol, a rhBMP-2 pôde ser finalmente obtida contendo menos contaminantes, associado a aumento da quantidade final da proteína (fig. 18. B).

Figura 18. SDS-PAGE: Purificação da rhBMP-2 produzida em *E. coli* Rosetta (DE3) pLysS BMP-2/32 32 (\cong 24KDa) por cromatografia de afinidade em coluna com resina de níquel pré equilibrada com tampões A: PBS 1x + Imidazol 25mM. e B: PBS 1x + Imidazol 10mM. As eluições foram realizadas com diferentes concentrações (Tampão PBS + Imidazol, 250 e 500 mM). kDa-padrão de peso molecular (66-45-29-20-14); **Poço 1:** Fração solúvel (pré coluna); **Poço 2:** proteínas não ligantes (Void); **Poço 3:** lavagem; **Poço 4:** frações eluídas com 250mM de Imidazol, ; **Poço 5:** fração eluída com 500mM de imidazol.



Fonte: Próprio autor.

A solubilidade da proteína foi um fator determinante na elaboração de protocolos para a purificação. O método de purificação escolhido, a cromatografia de afinidade por metal imobilizado (IMAC), apresentou resultados positivos, uma vez que as rhBMP-2 ligada à 6xHis-TagTM, apresentaram considerável afinidade pelo níquel e cobalto imobilizados nas resinas da coluna. Este método de purificação foi escolhido, visando a obtenção de um método prático e economicamente viável para a produção da rhBMP-2.

A escolha pela etiqueta de poli-histidina foi baseada no sucesso em sua utilização, devido a sua alta afinidade a íons de metais de transição (CO^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+}) e ao seu tamanho reduzido (variando de 2 a 10 resíduos). O tamanho da etiqueta de histidina obtida com o uso do vetor pET é de 6 resíduos. Devido ao seu tamanho reduzido, esta etiqueta raramente interfere na conformação e na atividade biológica da proteína alvo (TERPE, 2003).

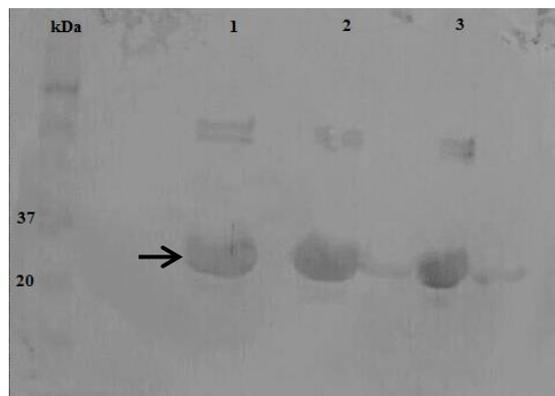
Neste estudo, o interesse foi encontrar meios para a obtenção de uma proteína mais pura, não focando a obtenção de grandes quantidades da proteína. No entanto, através do método utilizado de purificação por IMAC e das otimizações realizadas, conseguimos obter uma proteína cada vez mais pura, utilizando-se meios economicamente viáveis para a obtenção da proteína, o que pode servir como direcionamento em futuras práticas para a obtenção da proteína alvo. Posteriormente, a produção poderá ser direcionada a partir do

presente método visando o aumento do rendimento da proteína, com foco em possível aplicação comercial.

IMUNODETECÇÃO

Análise das amostras purificadas da rhBMP-2 submetidas à ensaio de imunodeteccção por Western-Blotting demonstraram a presença de uma banda com peso molecular estimado em aproximadamente 24 kDa, que é similar ao tamanho esperado da proteína em fusão com Trx.Tag e 6xHis-TagTM. Sendo assim, o anticorpo conjugado monoclonal *Anti-poly Histidine – Alkaline Phosphatase*, usado neste método como anticorpo detector, revelou a presença da rhBMP-2 em todas as amostras testadas.

Figura 19. Western Blotting, das frações purificadas de rhBMP-2. Marcador de tamanho molecular (kDa) (Precision Plus ProteinTM Standards Dual Color, Bio-Rad). Poços 1, 2 e 3: amostras de rhBMP-2 expressas em *E. coli* BL21 (DE3) e Rosetta (DE3) pLysS purificadas por cromatografia de afinidade em coluna de níquel (\cong 24 kDa).



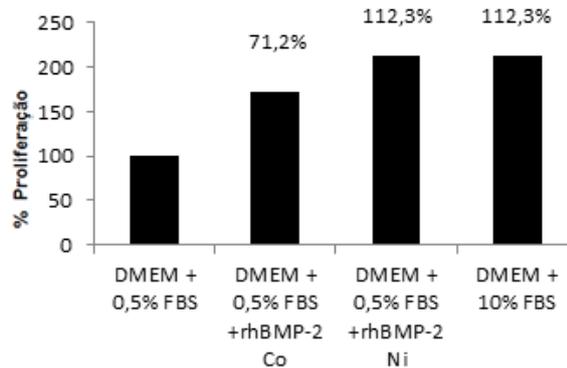
Fonte: Próprio autor.

ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO E VIABILIDADE CELULAR

O ensaio de proliferação celular foi realizado utilizando-se o método de MTT, que quando reduzido, formam cristais de formazan, sendo a sua formação diretamente proporcional à atividade mitocondrial e à viabilidade celular. Através dos resultados obtidos, observamos que as rhBMP-2 purificadas tanto em coluna de níquel como de cobalto, foram capazes de induzir a proliferação celular em células CTM, sendo que a proliferação se

mostrou mais significativa na proteína purificada em coluna de níquel, uma indução de 112% da proliferação em relação as células não tratadas com a proteína (Fig. 20).

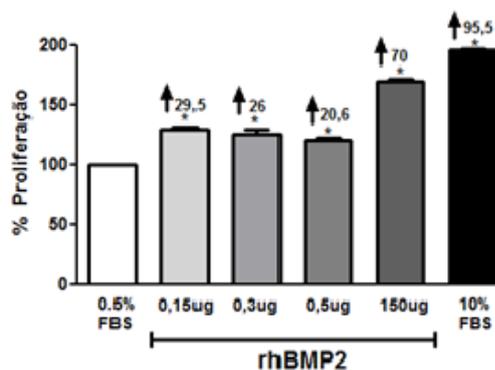
Fig. 20. Ensaio de proliferação e viabilidade celular (MTT) em CTM. Analisado por espectrofotometria (D.O=570nm). Valores em porcentagem. Proliferação celular em CTM induzidas por rhBMP-2 purificadas em coluna de cobalto e níquel; DMEM + 0,5% FBS, DMEM + 0,5% FBS + rhBMP-2(50 μ g) cobalto, DMEM + 0,5% FBS + rhBMP-2(50 μ g) níquel, DMEM + 10% FBS, respectivamente.



Fonte: Próprio autor.

Em ensaio realizado posteriormente utilizando-se células C2C12 tratadas com diferentes concentrações de rhBMP-2 purificadas em coluna de níquel, foi possível verificar significativa proliferação celular em todas as concentrações testadas (0,15 μ g, 0,3 μ g, 0,5 μ g e 150 μ g) sendo que na concentração de rhBMP-2 de 150 μ g, a proliferação foi mais expressiva, traduzindo-se em um aumento de 70% na proliferação celular em relação as células não tratadas com a proteína (Fig. 21).

Fig. 21. Ensaio de proliferação e viabilidade celular (MTT) em células C2C12. Analisado por espectrofotometria (D.O=570nm). Valores em porcentagem. Proliferação celular em C2C12 induzidas por rhBMP-2 purificadas em coluna de níquel; DMEM + 0,5% FBS, DMEM + 0,5% FBS + rhBMP-2(0,15 μ g), DMEM + 0,5% FBS + rhBMP-2(0,3 μ g), DMEM + 0,5% FBS + rhBMP-2(0,5 μ g), DMEM + 0,5% FBS + rhBMP-2(150 μ g), DMEM + 10% FBS, respectivamente.

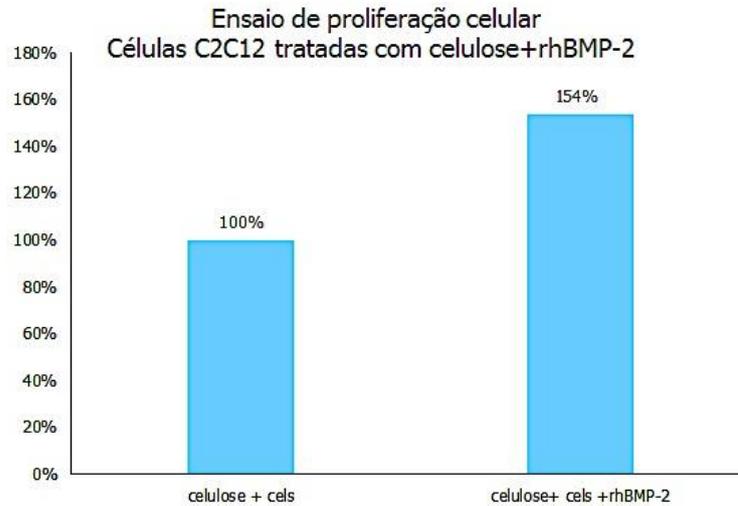


Fonte: Próprio autor.

ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR UTILIZANDO A rhBMP-2 IMOBILIZADA NA SUPERFÍCIE DE CELULOSE MODIFICADA

Em ensaio de proliferação celular utilizando o método MTT, foi observado maior proliferação celular em células C2C12 tratadas com gel contendo celulose modificada associada à rhBMP-2, quando comparada à proliferação destas células na presença apenas da celulose modificada (Fig. 22). Os resultados deste experimento são representados na Figura 22, na qual o crescimento celular na presença apenas da celulose modificada foi considerado 100% e na presença da celulose contendo rhBMP-2 imobilizada o crescimento foi 54 % maior, ou seja 154%. Este resultado é indicativo da ação da proteína, que pode ser considerada um promissor fator de crescimento para utilização em modificação de biomateriais para estímulo de crescimento celular.

Fig. 22. Ensaio de proliferação e viabilidade celular (MTT) utilizando a rhBMP-2 imobilizada na superfície de celulose modificada. Valores em porcentagem. Proliferação celular em C2C12 induzidas por rhBMP-2 purificada em coluna de níquel; DMEM + 0,5% FBS + celulose modificada + células C2C12 e DMEM + 0,5% FBS + celulose modificada com rhBMP-2 + células C2C12, respectivamente.



Fonte: Próprio autor.

6 CONCLUSÕES

* De acordo com os resultados foi possível a produção da rhBMP-2 em sistema bacteriano na forma solúvel em ambas linhagens utilizadas, tanto em *E. coli* BL21 (DE3) como em Rosetta (DE3) pLyS, sendo que a expressão foi mais pronunciada nesta última linhagem na temperatura de 20°C;

* O grau de pureza obtido na purificação por IMAC foi satisfatório, após as condições testadas de purificação;

* O ensaio de imunodeteção, confirmou a produção da proteína recombinante.

* Os resultados do teste da indução da rhBMP-2 sobre a proliferação celular em células C2C12 e CTMs, ambas de ratos, comprovou a atividade biológica da proteína;

* O resultado de indução da proliferação celular sobre células C2C12 utilizando celulose modificada associada à rhBMP-2 comprovou a eficácia da técnica de imobilização da proteína, na forma como foi produzida, em um biopolímero com potencial uso na medicina regenerativa.

7 PERSPECTIVAS FUTURAS

* Ensaios da diferenciação celular em CTMs de humanos;

* Clivagem da rhBMP-2 em fusão com Trx e His *Tag* através da enzima enterokinase;

* Utilização da proteína em diferentes suportes biológicos desenvolvidos pelo grupo BioPolMat da UNIARA, para funcionalização desses suportes no processo de celularização e posterior uso na medicina regenerativa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDIA, D. C.; CERRI, P. S.; SPOLIDORIO, L. C. Tecido ósseo: aspectos morfológicos e histofisiológicos. **Rev. de Odontologia da UNESP**, 35(2); 191-98, 2006.
- AUBIN, J. A.; TURKSEN, K.; HEERSCHE, J. N. M. Osteoblastic cell lineage. In: Edt. Noda, M., Cellular and Molecular Biology of Bone, **Academic Press**, San Diego, 2-45, 1993.
- BAUER, T. W.; MUSCHLER, G. F. Bone graft materials: an overview of the basic science. **Clinical Orthopaedics**, Philadelphia, v.371, p.10-27, 2000.
- BEGAM, H.; NANDI, S. K.; KUNDU, B., et al. Strategies for delivering bone morphogenetic protein for bone healing, **Mater. Sci. Eng., C**, [http:// dx.doi.org/10.1016/j.msec.2016.09.074](http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2016.09.074). (In Press), 2016.
- BESSA, P. C.; CASAL, M.; REIS, R. L. Bone morphogenetic proteins in tissue engineering: the road from the laboratory to the clinic, part I (basic concepts), **J. Tissue Eng. Regen. Med.** 2; 1–13, 2008.
- BESSA, P. C.; PEDRO, A. J.; KLÖSCH, B., et al. Osteoinduction in human fat-derived stem cells by recombinant human bone morphogenetic protein-2 produced in *Escherichia coli*. **Biotechnol. Lett.** 30, 15–21; 2008.
- BHATTACHARYA, M. Nanofibrillar cellulose hydrogel promotes three-dimensional liver cell culture. **J Control Release** 164:291–298, 2012.
- BISPO, L. B. O uso da proteína recombinante no aumento ósseo em Implantodontia. **Rev. bras. odontol.**, Rio de Janeiro, v. 72, n. 1/2, p. 30-6, jan./jun. 2015.
- BODEN, S. D. The ABCs of BMPs. **Orthop Nurs**; 24: 49-52; quiz 53-4, 2005.
- BONEWALD, L. F. The amazing osteocyte. **J Bone Miner Res.** Feb;26(2):229-38, 2011.

BOSTROM, M. P; ASNIS, P. Transforming growth factor beta in fracture repair. **Clin Orthop Relat Res.** Oct;(355 Suppl):S124-31, 1998.

BRESOLIN, I. T. L.; MIRANDA, E.A.; BUENO, S. M. A. Cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC) de biomoléculas: aspectos fundamentais e aplicações tecnológicas. **Quím. Nova**, São Paulo , v. 32, n. 5, p. 1288-1296, 2009.

CARREIRA, A. C.; LOJUDICE, F. H.; HALCSIK, E., et al. Bone morphogenetic proteins: facts, challenges, and future perspectives. **Journal of dental research.** 93(4):335-45, 2014.

CELESTE, A. J.; IANNAZZI, J. A.; TAYLOR, R. C., et al. Identification of transforming growth factor beta family members present in bone-inductive protein purified from bovine bone. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** v. 87, p. 9843-9847, 1990.

CHEN, D.; ZHAO, M.; MUNDY, G. R. Bone Morphogenetic Proteins. **Growth Factors**, December. Vol. 22 (4), pp. 233–241, 2004.

CHEN, L.H.; HUANG, Q.; WAN, L., et al. Expression, purification, and in vitro refolding of a humanized single-chain Fv antibody against human CTLA4 (CD152), **Protein Expr. Purif.** 46; 495– 502, 2006.

DUCY, P.; KARSENTY, G. The family of bone morphogenetic proteins. **Kidney Int.** Jun;57(6):2207-14, 2000.

EPSTEIN, S.; SCHLOSBERG, M.; FALLON, M.; THOMAS, S.; MOVSOWITZ, C.; ISMAIL, F. 1, 25 dihidroxivitamin D3 modifies cyclosporine-induced bone loss. **Calcif Tissue Int.** 47:152-7, 1990.

FELICIANO, P. R. Clonagem, expressão heteróloga e caracterização do gene LmjF24.0320 que codifica a enzima fumarato hidratase em *Leishmania major*. 112 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

FERRAZ, A. I.; RODRIGUES, A. S. Introdução à biotecnologia. Portugal, ano 1, s1, 2007.

FREITAS, R. M; NETO, R. S; MARCANTONIO, C., et al. O uso de rhBMP-2 para aumento ósseo maxilar: relato de caso clínico. **Rev Assoc Paul Cir Dent**; 66(2):110-7, 2012.

GANDINI, A. The irruption of polymers from renewable resources on the scene of macromolecular science and technology. *Green Chem* 13:1061–1083, 2011.

GARRIDO, C. A.; SAMPAIO, T. C. F. V. S. Uso da biocerâmica no preenchimento de falhas ósseas. **Rev. bras. ortop.** vol.45 no.4 São Paulo, 2010.

GAO, T.; LINDHOLM, T. S.; MARTTINEN, A., et al. Composites of bone morphogenetic protein (BMP) and type IV collagen, coral-derived coral hydroxyapatite, and tricalcium phosphate ceramics. **International Orthopaedics**, v. 20, n. 5, p. 321-325, 1996.

GENETICS INSTITUTE, Cambridge, Mass, unpublished reports, **The creation of rhBMP-** An overview of the recombinant technology process, 1995.

GIANNOUDIS, P. V.; DINOPOULOS, H.; TSIRIDIS, E. Bone substitutes: An update. **Injury**, *Int. J. Care Injured* 36S, S20—S27, 2005.

GOPAL G, KUMAR A. Strategies for the Production of Recombinant Protein in *Escherichia coli*. **Protein J.**;32:419-25, 2013.

HALSEY, M. F.; MC LEOD, K.; RUBIN, C. The Biology of Bone. In: Edts. Dee, R., Hurst, L. C., Gruber, M. A., Kottmeier, S. A. **Principles of Orthopaedic Practice**, The McGraw-Hill Companies, New York,17-36, 1997.

HOLMGREN, A. Thioredoxin and Glutaredoxin Systems. **The journal of biological chemistry**, Vol. 264, No. 24, Issue of August 25, pp. 13963-13966, 1989.

IHM, H. J.; YANG S. J.; HUH, J. W., et al. Soluble expression and purification of synthetic human bone morphogenetic protein-2 in *Escherichia coli*. **BMB Rep.**, 31; 41(5):404-7, May 2008.

ISSA, J. P. M.; DEFINO, H. L. A; PEREIRA Y. C. L., et al. Bone Repair Investigation Using rhBMP-2 and Angiogenic Protein extracted from látex. **Microscopy Research and Technique** 1-8, 2011.

JEONG, G. K.; SANDHU, H. S.; FARMER, J. Bone morphogenic proteins: Applications in spinal surgery. **HSS J.** 1, 110–117, sep., 2005.

JUNQUEIRA, L. C; CARNEIRO, J. Tecido ósseo. **Histologia básica**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan; p. 132-148; 2013.

KATAGIRI, T.; YAMAGUCHI, A.; KOMAKI, M., et al. Bone morphogenetic protein-2 converts the differentiation pathway of C2C12 myoblasts into the osteoblast lineage. **J Cell Biol.** Dec; 127(6 Pt 1):1755-66, 1994

KATAGIRI, T.; SUDA, T.; MIYAZONO, K. The bone morphogenetic proteins. In Miyazono K, Derynck R, editors. The TGF- β Family. **Cold Spring Harbor Press**, p.121-149. New York, 2008.

KATAGIRI, T.; OSAWA, K.; TSUKAMOTO, S., et al. Bone morphogenetic protein-induced heterotopic bone formation: What have we learned from the history of a half century. **Japanese Dental Science Review** 51, 42-50, 2015.

KIM, C. S.; KIM, J. I.; KIM. J., et al. Ectopic bone formation associated with recombinant human bone morphogenetic proteins-2 using absorbable collagen sponge and beta tricalcium phosphate as carriers. **Biomaterials**, 26(15):2501-7, 2005.

KIM, S. E.; YUN, Y. P.; HAN, Y. K., et al. Osteogenesis induction of periodontal ligament cells onto bone morphogenic protein-2 immobilized PCL fibers, **Carbohydrate Polymers**, 99, pp. 700-709, 2014.

KING, G. N.; COCHRAN, D. L. Factors that modulate the effects of bone morphogenetic protein-induced periodontal regeneration: a critical review. **J Periodontol**, 73:925–36, 2002.

KIRKER-HEAD; C. A. Potential applications and delivery strategies for bone morphogenetic proteins, **Adv. Drug Deliv. Rev.** 43; 65–92, 2000.

KLEMM, D. Cellulose: fascinating biopolymer and sustainable raw material. **Angew Chem Int. Ed** 44:3358–3393, 2005.

KOBAYASHI, S., et al. 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, 2009.

LEE, J. H.; KIM, C. S; CHOI, K. H., et al. The induction of bone formation in rat calvarial defects and subcutaneous tissues by recombinant human BMP-2, produced in *Escherichia coli*. **Biomaterials**, 31:3512–3519, 2010

LEE, S. S.; HUANG, B. J.; KALTZ, S. R., et al. Bone regeneration with low dose BMP-2 amplified by biomimetic supramolecular nanofibers within collagen scaffolds, **Biomaterials**, 34, pp. 452-459, 2013.

LEE K.; JOHNSON, J. S.; SONG, K., et al. Use of Autogenous Bone Graft Compared With RhBMP in High-risk Patients: A Comparison of Fusion Rates and Time to Fusion. **Journal of Spinal Disorders and Techniques**. 26(5):233–238, 2013.

LEHNINGER, A.L. *Princípios de Bioquímica*. 5ed. São Paulo: Sarvier, 2011.

LI, J.; JIN, L.; WANG, M., et al. Repair of rat cranial bone defect. By using bone morphogenetic protein-2 related peptide combined with microspheres composed of polylactic acid/polyglycolic acid copolymer and chitosan. **Biomed. Mater.** Jul, 1-10, 2015.

LI, J.; HONG, J.; ZHENG, Q., et al. Repair of rat cranial bone defects with nHAC/PLLA and BMP-2- related peptide or rhBMP-2. **Journal of Orthopaedic Research** , Nov 1745-1752, 2011.

LIN, N. Nanocellulose in biomedicine: current status and future prospect. **Eur Polymer J** 59:302–325, 2014.

LIM, H.; MERCADO, A. E.; YUN, K., et al. The effect of rhBMP-2 and PRP delivery by biodegradable β -tricalcium phosphate scaffolds on new bone formation in a non-through rabbit cranial defect model. **J Mater Sci Mater Med.**; 24(8): 1895–1903, 2013.

LISSENBERG-THUNNISSEN, S. N.; DE GORTER, D.J.; SIER C.F., et al. Use and efficacy of bone morphogenetic proteins in fracture healing. **Int Orthop** 35:1271-1280, 2011.

LONG, S.; TRUONG, L.; BENNETT, K., et al. Expression, purification, and renaturation of bone morphogenetic protein-2 from Escherichia coli. **Protein Expr. Purif.** 46, 374-378, 2006.

MACKIE, E. J. Osteoblasts: novel roles in orchestration of skeletal architecture. **Int J Biochem Cell Biol.**, 35:1301-5, 2003.

MARKS, S. C.; POPOFF, S. N. Bone cell biology: the regulation of development, structure, and function in the skeleton. **Am J Anat.** Sep;183(1):1-44, 1988

MARTIN, T. J.; FINDLAY, D. M.; HERTH, J. K.; NG, K. W. Osteoblasts: Differentiation and Function. In: Edts. Mundy, G. R., Martin, T. J. **Handbook of Experimental Pharmacology**, Springer-Verlag,. Berlin, Vol. 107, 149-183, 1993.

MC KAY, W. F.; PECKHAM, S. M.; BADURA, J. M. A comprehensive clinical review of recombinant human bone morphogenetic protein₂ (INFUSE Bone Graft). **Int. Orthoped.** 31, 729–734, 2007.

MIYAZONO, K.; KAMIYA, Y.; MORIKAWA, M. Bone morphogenetic protein receptors and signal transduction. **J Biochem** 147:35-51, 2010.

MUNDY, G. R. Inflammatory mediators and the destruction of bone. **J Periodontal Res.**; 26:213-7, 1991.

NIU, X. F.; FENG, Q. L.; WANG, M. B., et al. Porous nano-HA/collagen/PLLA scaffold containing chitosan microspheres for controlled delivery of synthetic peptide derived from BMP-2. **J Control Release** 134:111–117, 2009.

PANG, E. K; IM, S. U.; KIM, C. S., et al. Effect of recombinant human bone morphogenetic protein-4 dose on bone formation in rat calvarial defects. **J Periodontol** Oct;75(10):1364-70, 2004.

POON, B.; KHA, T.; TRAN, S., et al. Bone morphogenetic protein-2 and bone therapy: successes and pitfalls. Royal Pharmaceutical Society. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, 68, pp. 139-147, 2016.

QIN, W.; YANG, F.; DENG, R., et al. 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, 2012.

RAISZ, L. G., RODAN, G. A. Embriology and cellular biology of bone. In: Avioli LV, Krane SM. Metabolic bone diseases and clinically related disorders. San Diego: **Academic Press**; p. 1-22, 1998.

REBECCA, H. L; WOZNEY, J. M. Delivering on the promise of bone morphogenetic proteins. **Trends Biotechnol.** 19(7):255-65, 2001.

RETNONINGRUM, D. S.; PRAMESTI, H. T.; SANTIKA, P. Y., et al. Codon optimization for high level expression. Of human bone morphogenetic protein-2 in *Escherichia coli*. **Protein Expression and Purification** 84; 188-194, 2012.

ROBBINS, S. L.; COTRAN, R. S. Ossos, articulações e tumores de partes moles. Patologia: **Bases patológicas das doenças**. 8ª Edição. Rio de Janeiro: Elsevier. P. 1213-18, 2010.

ROBLING, A. G.; NIZIOLEK, P. J.; BALDRIDGE, L. A., et al.: Mechanical stimulation of bone in vivo reduces osteocyte expression of Sost/sclerostin. **J Biol Chem** 283:5866, 2008.

ROSEN, V.; COX, K.; HATTERSLEY, G. Bone morphogenetic proteins, in Principles of Bone Biology, edited by BILEZIKIAN, J.P, RAISZ, L.G; RODAN, G.A. San Diego, **Academic Press, Inc.**, pp 661–671, 1996.

SAKOU T. Bone morphogenetic proteins: From basic studies to clinical approaches. **Bone**. 22, 591–603, 1998.

SANTOS, A. A; MIRANDA, C. D. O; ALVES, M. T. S, et al. O papel da proteína Morfogénica óssea na reparação do tecido ósseo. **Acta Ortop Bras** 13(4), 2005.

SCHEUFLER, C.; SEBALD, W.; HULSMEYER, M. Crystal structure of human bone morphogenetic protein-2 at 2.7 Å resolution. **J. Mol. Biol.** 287, 103-115, 1999.

SENTA, H.; PARK, H.; BERGERON, E., et al. Cell responses to bone morphogenetic proteins and peptides derived from them: biomedical applications and limitations. **Cytokine & growth factor reviews**. 20(3):213-22, 2009.

SINGH, M. Biodegradation studies on periodate oxidized cellulose. **Biomaterials** 3:16–20, 1982.

SHARAPOVA, N. E.; KOTNOVA, A. P.; GALUSHKINA; N. V., et al. Production of the Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein2 in Escherichia coli and Testing of Its Biological Activity in vitro and in vivo. **Molecular Biology**, Vol. 44, No. 6, pp. 923–930; 2010.

SHUE, L.; YUFENG, Z.; MONY, U. Biomaterials for periodontal regeneration: a review of ceramics and polymers. **Biomatter** 2 271–7, 2012.

SODEK J, MCKEE M. E. Molecular and cellular biology of alveolar bone. **Periodontology**; 24:99-126, 2000.

SOLOFOMALALA, G. D.; GUERY, M.; LESIOURD, A., et al. Bone morphogenetic proteins: from their discoveries till their clinical applications. **Eur J Orthop Surg Traumatol.**,17(6):609-15, 2007.

SULKOWSKI, E. The saga of IMAC and MIT. **Bioessays**, 10, 170, 1989.

TERPE, K. Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, Nova York, v.60. p.523-33, 2003.

TROVATTI, E., CUNHA A. G., CARVALHO A. J. F. et al. Furan-Modified Natural Rubber: A Substrate for Its Reversible Crosslinking and for Clicking It Onto Nanocellulose. **Int J Biol Macromol** 95, 762-768, 2016.

URIST, M. R. Bone: formation by autoinduction. **Science**; 150:893-9, 1965.

URIST, M. R. Strates B. S. Bone morphogenetic protein. **J. Dent. Res.** 50, 1392–1406, 1971.

VAN HOUT, W. M., et al. Reconstruction of alveolar cleft: can growth factor-aided tissue engineering replace autologous bone grafting? A literature review and systematic review of results obtained with bone morphogenetic protein-2. **Clin Oral Investig** 15: 297-303, 2011.

VON EINEM, S.; SCHWARZ, E.; RUDOLPH, R. A novel TWO-STEP renaturation procedure for efficient production of recombinant BMP-2. **Protein Expr Purif** 73(1):65–69. doi:10.1016/j.pep.2010.03.009, 2010.

VALENZUELA, J. C. B. Análise dos genes diferencialmente expressos durante a osteodiferenciação induzida por proteínas morfogenéticas de osso (BMP2 e BMP7) em células C2C12 e super-expressão de rhBMP2 e rhBMP7 em células de mamíferos. 161 f. Tese (Doutorado em Ciências - Bioquímica) – Instituto de Química. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

VALLEJO, L. F.; BROKELMANN, M.; MARTEN, S., et al. Renaturation and purification of bone morphogenetic protein_2 produced as inclusion bodies in high-cell-density cultures of recombinant *Escherichia coli*. **J. Biotechnol.** 94, 185–194; 2002.

WANG, E. A.; ROSEN, V.; CORDES, P., et al. Purification and characterization of other distinct bone-inducing factors. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 85; 9484-9488; 1988.

WANG, E. A.; ROSEN, V.; D'ALESSANDRO, J. S., et al. Recombinant human bone morphogenetic protein induces bone formation. **Proc Natl Acad Sci USA**; 87:2220-4, 1990.

WATZEK, G. 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, 2004.

WOZNEY, J. M.; ROSEN, V.; CELESTE, A. J. Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. **Science**, Washington, v.242, n.4885, p.1528-1534, 1988.

WOZNEY, J. M; ROSEN, V. Bone morphogenetic protein and bone morphogenetic protein gene family in bone formation and repair. **Clin Orthop**, v.346, p.26-37; 1998.

YAMAGUCHI, A.; KATAGIRI, T.; IKEDA, T., et al. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 stimulates osteoblastic maturation and inhibits myogenic differentiation in vitro. **J Cell Biol**; 113:(3):681-7; 1991.

ZHANG, H.; WU, J.; ZHANG, Y., et al. Optimized procedure for expression and renaturation of recombinant human bone morphogenetic protein-2 at high protein concentrations. **Molecular Biology Reports**; 37(7):3089-309; 2009.

ZHANG, I.; MA, Y.; YANG, M., et al. Expression, purification and refolding of a recombinant human bone morphogenetic protein 2 in vitro. **Protein Expression and Purification** 75; 155-160; 2011.