

Aplicaciones de la biología molecular en el aparato locomotor

(proteína morfogenética ósea)

Current applications of molecular biology in orthopedics

(bone morphogenetic protein)

JUAN-PABLO CARRILLO MATEOS*, BELÉN CARRILLO RIVAS**

* SERVICIO DE CIRUGÍA ORTOPÉDICA Y TRAUMATOLOGÍA. HOSPITAL UNIVERSITARIO MARQUÉS DE VALDECILLA, SANTANDER.

** DEPARTAMENTO DE BIOLÓGIA MOLECULAR. UNIVERSIDAD DE HAVARD. BOSTON, EEUU.

Resumen. La biología molecular constituye actualmente la base de la investigación biomédica. Gracias a las modernas técnicas de transcripción inversa es posible obtener in vitro proteínas humanas en gran cantidad. Un ejemplo de ello es la proteína morfogenética ósea recombinante humana (rhBMP), utilizada hasta ahora en forma experimental debido a la disparidad de resultados observados en animales de experimentación y en humanos. Existen aún preguntas importantes que se deben responder antes de poder usar estas moléculas en la práctica clínica habitual. Los nuevos avances de la biología molecular hacen pensar que en el futuro la medicina cambiará dramáticamente, siendo el campo de la manipulación genética el horizonte inmediato.

Summary. Currently, molecular biology is the base of biomedical research. Thanks to reverse transcription techniques, it is possible to obtain in vitro large amounts of human proteins. One example is the recombinant human bone morphogenetic protein (rhBMP), which is now used only in experimental and clinical research due to the disparity observed between the results on animal models and humans. There are important questions that must be answered before rhBMPs can be routinely used. New advances in molecular biology indicate a dramatic change in future medical practice, with genetic manipulation in the immediate sight.

Introducción. Desde hace aproximadamente dos décadas el mundo del saber médico está sometido a una serie de nuevos conceptos que hacen presentir que, en pocos años, habrá que variar los métodos y formas que ahora usamos en nuestra profesión. Hasta ahora los grandes cambios en el que hacer médico han sido fruto más de la observación que de la investigación; como el descubrimiento de la anestesia por Wells, la antisepsia por Lister o los antibióticos por Fleming. Pero el gran avance de la biología molecular con el descifrado completo del código genético y su manejo para conocer sus expresiones vitales, las proteínas, elementos esenciales del ser vivo, ha hecho que esta rama del conocimiento, junto con la física, sean las disciplinas de la ciencia más prometedoras actualmente.

Conceptos básicos de la Biología molecular.

El gen se puede definir como un segmento de ácido desoxirribonucleico (ADN), que codifica las claves esenciales para que se reproduzcan los distintos caracteres de la herencia; es el núcleo fundamental donde se guarda la información genética. Los genes se encuentran alineados formando los cromosomas y su número varía alrededor de 100.000 en el hombre. Ya han sido identificados pero aún queda un largo trecho hasta conocer sus expresiones proteicas y, dentro de estas, cual es el segmento activo que las hace distintas a las demás y, lo que es más difícil, cómo se pueden modificar sus características en caso necesario. El premio Nobel James D. Watson dijo (1): "No existe en la naturaleza ninguna sustancia tan importante como el ADN. Es la molécula fundamental de la vida,

Correspondencia:

Dr. Juan Pablo Carrillo Mateos
C/ Cádiz 10,1ªA
39002 - Santander

por que lleva en su estructura la información hereditaria que determina la génesis proteica. Contiene las instrucciones que gobiernan el crecimiento y división de la célula, y la diferenciación de óvulo fertilizado en multitud de células especializadas necesarias para la vida de las plantas y los animales, y admite un número casi infinito de variantes químicas intercambiables. El ADN ha sido la base del proceso evolutivo que ha generado los millones de formas de la vida que han ocupado la superficie de la tierra desde hace cuatro mil millones de años. La extraordinaria capacidad de las variantes del ADN para originar nuevas formas de vida, con mayor aptitud para sobrevivir de sus antecesores inmediatos, ha hecho posible la aparición de nuestra especie, por su aptitud para comprender la naturaleza de su entorno y utilizar esta información en la evolución de la existencia del hombre actual. Este ácido el ADN, entraña la clave para que el hombre que por su acción se ha desarrollado, pueda en su día conocer el origen y la evolución del proceso vital".

El ADN consiste en una secuencia de tres sub-unidades unidas químicamente. Cada sub-unidad consta de un azúcar pentosa (azúcar de cinco átomos de carbono en forma de anillo), una base nitrogenada (anillo heterocíclico de átomos de nitrógeno y carbono) y un grupo fosforilado (2). El azúcar y el grupo fosforilado son comunes en todas las sub-unidades. Pero lo que da los caracteres diferenciales a las moléculas de ADN es el orden sucesivo de las bases nitrogenadas. Dichas moléculas son compuestos químicos estables que en un medio acuoso liberan un grupo hidroxilo (OH). En los ácidos nucleicos ADN (desoxirribonucleico) y ARN (ribonucleico), en los que la pentosa es una ribosa, las bases nitrogenadas se dividen en dos grupos: las bases purínicas Adenina (A) y Guanina (G), y las pirimidínicas Citosina (C), Timina (T) y Uracilo (U).

Los ácidos nucleicos son los depositarios de la información genética y los mediadores de su transformación en proteínas. Están constituidos por nucleótidos (sub-unidades integradas por una base nitrogenada, un azú-

car pentosa y un grupo fosfato), unidos entre sí por un enlace fosfodiéster. Las moléculas de ADN se componen de dos cadenas polinucleotídicas enrolladas en espiral. La parte azucarada y fosforilada forma el esqueleto donde las bases nitrogenadas se asientan mirando al interior, apareadas unas con otras de forma que una base purínica se encuentra siempre alineada con una pirimidínica. En el ADN la adenina es complementaria de la timina, y la guanina de la citosina, las primeras están unidas por dos enlaces de hidrógeno y las segundas por tres. En el ARN la timina es sustituida por el uracilo.

Se pueden utilizar técnicas in vitro para manipular el ADN; por ejemplo, las dos cadenas polinucleotídicas que lo constituyen pueden cortarse por la acción de una enzima de restricción (restrictasa), volver a unirse por la acción de otra llamada ligasa y replicarse por medio de una tercera que se denomina polimerasa. En relación con la localización intracelular, el ADN se encuentra en el núcleo y las mitocondrias. Por su parte el ARN, que es sintetizado en el núcleo por un proceso llamado transcripción del ADN, después de sufrir ciertas modificaciones (eliminación de intrones o regiones no codificantes, en inglés RNA splicing), migra al citoplasma donde dirige la síntesis de las proteínas en un proceso llamado traducción del ADN. Por esta razón se le conoce como ARN mensajero (ARNm). La traducción de las moléculas de ARN en una proteína se lleva a cabo con la ayuda de otras moléculas de ARN complementarias, llamadas ARN ribosomial (ARNr) y ARN de traducción (ARNt). El ARNr junto con un grupo de proteínas forman los ribosomas que es complejo molecular donde el ARNm es traducido. El ARNt son las moléculas "adaptadoras" que reconocen los aminoácidos y el grupo de tres nucleótidos específico de cada una de ellos (3,4). La transcripción y la traducción de los genes localizados en las mitocondrias se llevan a cabo en su interior.

Las proteínas son los productos finales que expresan la información contenida en los ácidos nucleicos e intervienen en todas las reacciones orgánicas. Sus funciones fun-

damentales son catalíticas, reguladoras, estructurales, soporte mecánico, transporte, acumulación de sustancias, movimiento, reacciones inmunes. Todas las proteínas provienen de un grupo de veinte aminoácidos correspondiendo a cada una de ellos un triplete de bases en el código genético. En estos compuestos orgánicos se encuentra un grupo amínico y otro carboxílico unidos al mismo átomo de carbono, diferenciándose unos de otros por su estructura, solubilidad en agua, sus cadenas laterales que pueden variar en tamaño, y su carga eléctrica (5). Los aminoácidos se unen entre sí por enlaces covalentes denominados enlaces peptídicos formando cadenas. Las proteínas son macromoléculas formadas por la asociación de una o más cadenas de polipéptidos.

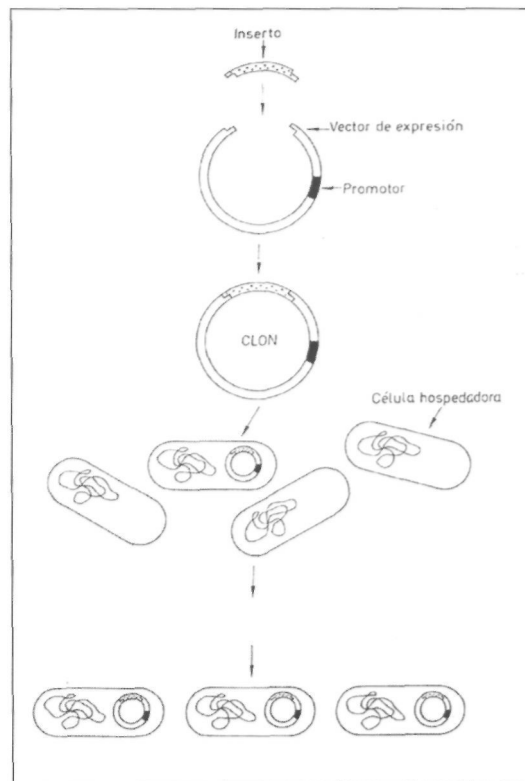
El PCR (del inglés polymerase chain reaction) es uno de los grandes descubrimientos de este siglo que ha supuesto el gran avance de la biología molecular. Fue descubierto por Mullis, de la Universidad de California, y por ello se le concedió el premio Nóbel en 1993. Por la acción de una enzima llamada polimerasa permite replicar cuantas veces se quiera un segmento específico del ADN genómico, o secuencia del ADN codificante procedente de una molécula de ARNm. Gracias a esa técnica, un tramo de ADN puede replicarse y almacenarse hasta indefinidamente. Gracias a ésta técnica se puede trabajar con genes que fisiológicamente se expresan en bajas cantidades, así como introducir modificaciones en las moléculas de ADN a conveniencia.

Cómo se obtiene la proteína morfogenética (BMP) *in vitro* (Fig. 1). Si tomamos como ejemplo el aparato locomotor, hablaríamos de las proteínas morfogenéticas óseas (BMP, del inglés bone morphogenetic protein), las cuales promueven y mantienen la formación del hueso (6). Actualmente se han aislado unas veinte proteínas morfogenéticas con diferente actividad; las 2, 4 y 7, son las más investigadas, y al parecer las activas. Todas ellas proceden del grupo TGF- β (superfamilia de polipéptidos responsables de los cambios morfogenéticos). Actualmente se puede pro-

ducir *in vitro* la expresión de la BMP, y como ejemplo vamos a referirnos de la BMP-2/4 humana (7,8).

El ADN codificante de la BMP se obtiene del ARNm que la codifica, el cual se pueden aislar de las células óseas. Por una técnica *in vitro* llamada de transcripción inversa, el ARNm se convierte en una molécula de ADN codificante por la acción de la enzima conocida como transcriptasa inversa. La nueva molécula de DNA se puede producir en grandes cantidades por la acción del PCR. Posteriormente se toma el segmento de ADN codificante de la BMP (llamado inserto), y por la acción combinada de una o varias enzimas de restricción y una ligasa, se inserta dentro de una segunda molécula de ADN llamada vector de expresión, que va a actuar como molécula portadora. El vector de expresión lleva integrado un promotor (segmento de ADN específico situado antes del gen) el cual va a dirigir la producción de la BMP en grandes cantidades dentro de una célula en la que se introduce, llamada célula hospedadora.

Por un proceso llamado "transformación", la molécula de ADN sintetizada *in vitro* (ADN codificante y vector de expresión) se introduce dentro de las células hospedadoras, las cuales pueden ser bacterianas (8) o procedentes de mamíferos (9). Dentro de ellas la BMP comienza a producirse con la maquinaria enzimática propia de la célula, denominándose proteína morfogenética ósea recombinante humana (del inglés recombinant human morphogenetic protein, rhBMP). La producción de la rhBMP también se puede hacer utilizando virus (7). Dependiendo del tipo de procedimiento escogido para la obtención de la proteína recombinante, esta se



secreta al medio de cultivo o se almacena dentro de la célula. Una vez sintetizada in vitro, se procede a su purificación.

Por regla general, para obtener un alto grado de pureza se necesita combinar distintos procedimientos. El más corriente es el llamado "cromatografía de afinidad", y se basa en las interacciones que ocurren en la superficie de las proteínas, utilizando estas propiedades para seleccionar la proteína deseada. Este procedimiento ha sido utilizado por numerosos grupos de investigación para purificar la rhBMP-2/4 basándose en su capacidad de unirse a la heparina (7,8).

Una vez sintetizada la BMP por técnicas in vitro, se pasa por una columna de sefrosa que tiene heparina incorporada. Un lavado especial arrastra los productos no deseados (por ejemplo, otras proteínas que encuentran en el medio de cultivo, etc). Después de los lavados, se pasa una solución salina por la columna haciendo que la rhBMP se separe de la heparina y se pueda recuperar obteniendo así rhBMP altamente purificada. Procedimientos adicionales pueden llevarse a cabo para obtener aún mayor índice de pureza, como la utilización de geles de proteínas para aislar distintas formas proteicas obtenidas en el proceso de cromatografía de afinidad (7) o la HPLC (del inglés high performance liquid chromatography). La rhBMP-2 purificada se ha mostrado eficaz induciendo la formación del hueso en animales de experimentación (7,10-15).

La inducción y diferenciación del hueso dependen de diversos factores mecánicos, como las fuerzas físicas y el microclima en la matriz extracelular, así como de factores moleculares. Los factores mecánicos se pueden reconstruir utilizando otros materiales como el colágeno, hidroxiapatita, glicoproteínas involucradas en la adhesión celular y proteoglicanos (6). Estos materiales pueden actuar como portadores de la proteína morfogenética contribuyendo a la regeneración ósea (6,9). Por ejemplo, Ripamonti et al (10,11) indujeron a la formación de hueso en pericráneos de mandriles, con la implantación de rhBMP-7 en combinación de una matriz de colágeno insoluble, aislada de bovinos o mandriles. Otros estudios mostraron la potente habilidad

oste-inductiva de la rhBMP-2 en conejos cuando esta fue implantada en el cubito junto con micropartículas de ácido glicólico poliláctico usado como portador (15).

En relación con los factores moleculares, la interacción de la BMP con sus receptores, así como la cascada de señales moleculares que esta unión desencadena, son de gran importancia para la formación del tejido óseo. Nifuji et al (6), mostraron que la implantación de BMP-2/4 en el mesodermo y ectodermo dorsal del embrión de pollo, donde se expresan ligandos de BMP y sus receptores, perturba la cascada de señales moleculares que esta unión desencadena. Estos resultados sugieren la posible conexión entre las BMP y el desarrollo del esqueleto.

Consideraciones actuales. Los estudios en animales de experimentación han dado unos resultados provisionales que hicieron concebir unas esperanzas desmesuradas en cuanto a su interpretación. Así, se supone que la BMP tiene efecto osteoinductivo para restaurar los defectos de masa ósea, acelera la formación ósea en las artrosis vertebrales, ayuda a la osteo-integración en los implantes protésicos, ayuda en la revascularización de los injertos óseos y tiene un papel determinante en la restauración de los defectos osteocronales.

Los estudios en animales de experimentación han dado unos resultados dispares con los obtenidos en seres humanos, existen una serie de problemas aún no resueltos que enumeramos:

- a) Que dosis es la correcta en el humano.
- b) Cual es la superficie a "cubrir" por la BMP.
- c) Cuanto tiempo debe permanecer la proteína en contacto con el hueso y cual es la duración de su capacidad activa.
- d) Cual es el mejor vehículo de transporte (en inglés carrier).
- e) Cuando y como se elimina.
- f) Cuales son sus posibles efectos adversos
- g) Cual es su mecanismo de acción exacto

De acuerdo con nuestra información, los estudios realizados han producido resultados desiguales. Por ello, se han restringido las aplicaciones de este producto hasta tanto

no se aclaren por completo los puntos anteriormente reseñados.

Se ha propuesto que cada ser humano tiene una compatibilidad específica para cada una de las proteínas sintetizadas. Si ponemos como ejemplo la sangre, para que no se produzcan problemas en las transfusiones no es suficiente que sea de la misma especie. Quizás habrá que estudiar algunos factores desconocidos hasta ahora en cuanto a la BMP, pero que en nuestra opinión, no invalidan el gran éxito que supone haber conseguido su obtención, y su importantísima proyección futura.

El conocimiento del genoma humano, con su indiscutible importancia, es solo el campo de trabajo futuro. Por ahora no se conoce en que cromosoma se ubican los genes de la osteogenesis y la condrogénesis y, al parecer, no existe sólo un gen que los regula sino que pueden existir varios con distintas expresiones proteicas que, si bien son osteogénicas, lo pueden ser en distinto grado según las condiciones específicas del medio donde actúen. Cuando de identifiquen los núcleos activos de las diversas proteínas que influyen en la osteogénesis se

podría solucionar el problema puesto que con técnicas de biología molecular *in vitro* puede variar o cambiar el núcleo activo de la proteína y modificar su comportamiento.

La Naturaleza se resiste a entregar sus secretos y se necesitan muchas horas de trabajo para descubrir los caminos correctos en la investigación. Severo Ochoa, premio Nobel por su descubrimiento del ARN, decía "el hombre llegará a conocer el origen de la vida, pero no podrá crearla". Los nuevos avances de la biología molecular hacen pensar que en el futuro la medicina variará en la forma de actuar. Posiblemente será la medicina celular la que se imponga. Se diseñaran pruebas para detectar el deterioro celular, pruebas indirectas que puedan alertar al médico cuando aparezca un trastorno en su función y, mediante los sistemas de modificación de los genes o el trasplante de órganos clonados, la práctica médica ha de cambiar. Quizás se pueda alargar la vida del hombre y no es temerario suponer que se puedan clonar humanos a voluntad. La pregunta sería: ¿Valdrán para el hombre del futuro los conceptos éticos, religiosos, morales e incluso legales ahora en vigor? ■■■■■

Bibliografía

1. **Watson J, Gilman M, Witkowski J, Zoller M (Eds).** Recombinant DNA. New York: Freeman and Co., 1992.
2. **Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson J (Eds).** Molecular Biology of the Cell. 2ª Edc. New York: Garland Publishing Inc., 1989. pp. 202-18.
3. **Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson J (Eds).** Molecular Biology of the Cell. 7 Edc. New York: Garland Publishing Inc., 1989. pp. 41-63.
4. **Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson J (Eds).** Molecular Biology of the Cell. 7 Edc. New York: Garland Publishing Inc., 1989. pp. 167-95.
5. **Hammonds RG Jr, Schwall R, Dudley A, y cols.** Bone-inducing activity of mature BMP-2b produced from a hybrid BMP-2a/2b precursor. *Mol Endocrinol* 1991; 5:149-55.
6. **Nifuji A, Kellermann O, Kuboki Y, y cols.** Perturbation of BMP signaling in somitogenesis resulted in vertebral and rib malformations in the axial skeletal formation. *J Bone Miner Res* 1997 ;12:332-42.
7. **Ishida N, Tsujimoto M, Kanaya T, y cols.** Expression and characterization of human bone morphogenetic protein-2 in silkworm larvae infected with recombinant Bombyx mori nuclear polyhedrosis virus. *J Biochem* 1994; 115:279-85.
8. **Lewis JO, Crews ST.** Genetic analysis of the *Drosophila* single-minded gene reveals a central nervous system influence on muscle development. *Mech Dev* 1994; 48:81 -91.
9. **Thomas R, Anderson WA, Raman V, y cols.** Androgen-dependent gene expression of bone morphogenetic protein 7 in mouse prostate. *Prostate* 1998; 37:236-45.
10. **Ripamonti U, Van Den Heever B, Sampath TK, y cols.** Complete regeneration of bone in the baboon by recombinant human osteogenic protein-1 (hOP-1, bone morphogenetic protein-7). *Growth Factors* 1996; 13:273-89.
11. **Ripamonti U, Heliotis M, van den Heever B, y cols.** Bone morphogenetic proteins induce periodontal regeneration in the baboon. *J Periodontal Res* 1994; 29:439-45.
12. **Ruppert R, Hoffmann E, Sebald W.** Human bone morphogenetic protein 2 contains a heparin-binding site which modifies its biological activity. *Eur J Biochem* 1996; 237:295-302.
13. **Sampath TK, Reddi AH.** Homology of bone-inductive proteins from human, monkey, bovine, and rat extracellular matrix. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; 80:6591-5.
14. **Wang EA, Rosen V, Cordes P, y cols.** Purification and characterization of other distinct bone-inducing factors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85:9484-8.
15. **Bostrom M, Lane JM, Tomin E, Browne M, y cols.** Use of bone morphogenetic protein-2 in the rabbit ulnar nonunion model. *Clin Orthop* 1996; 327:272-82.