

U. PORTO



FACULDADE DE
MEDICINA DENTÁRIA
UNIVERSIDADE DO PORTO

“REGENERAÇÃO ÓSSEA E ATUAÇÃO DA BMP-2 NA DESMINERALIZAÇÃO DA MATRIZ DE DENTINA”

ESTELLE ALEXANDRA ALVES DA FONTE

Dissertação de Mestrado

Mestrado em Reabilitação Oral à Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto

PORTO, 2020

“REGENERAÇÃO ÓSSEA E ATUAÇÃO DA BMP-2 NA DESMINERALIZAÇÃO DA MATRIZ DE DENTINA”

ESTELLE ALEXANDRA ALVES DA FONTE

Orientador:

Prof. Doutor João Carlos Antunes Sampaio Fernandes

Professor Catedrático da Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto

Coorientadora:

Prof. Doutora Inês Sansonetty Gonçalves Côrte-Real

Professora Auxiliar Convidada da Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto

Dissertação de Mestrado especialmente elaborada para obtenção de aprovação final no Curso de Mestrado em Reabilitação Oral da Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto – Diretor Prof. Doutor Sampaio Fernandes

RESUMO

INTRODUÇÃO: A extração dentária é um dos procedimentos clínicos mais realizados na área da medicina dentária e as consequências deste ato médico estão bem documentadas na literatura científica. Para evitar uma perda óssea significativa e para não comprometer a futura zona a reabilitar, vários materiais de enxerto ósseo têm sido desenvolvidos. Recentemente a matriz de dentina desmineralizada tem sido estudada como potencial material de enxerto ósseo devido principalmente a presença de BMP-2 na sua composição.

OBJETIVO: Investigar a capacidade regeneradora da matriz de dentina desmineralizada bem como tentar esclarecer a função da proteína morfogenética óssea 2 neste processo.

MATERIAIS E MÉTODOS: Para a realização deste estudo foi realizada uma pesquisa bibliográfica na base de dados PubMed® (National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine) com as seguintes palavras-chave: *Autogenous tooth bone graft* e *demineralized dentin matrix*. A pesquisa preconizada incluiu todo o tipo de artigos e foi limitada aos últimos 10 anos (2010-2020) e aos idiomas português, inglês, francês e espanhol. Dos 289 artigos obtidos, 40 artigos foram selecionados com base na relevância do título e resumo para a realização desta dissertação.

RESULTADOS: Estudos recentes reconheceram a semelhança da matriz de dentina ao osso autólogo por possuir as características ideais para formação óssea, comprovando a sua utilidade em situações de necessidade de regeneração óssea. Nestas circunstâncias constatou-se que a matriz de dentina não desmineralizada não conseguia induzir tão facilmente a formação de osso novo, por possuir uma composição mineral e cristalinidade elevada, e, reduzida porosidade, o que interfere na migração, ligação e proliferação das células vasculares e mesenquimais. Por outro lado, verificou-se que a matriz de dentina (proveniente de dentes autólogos ou alógenos) quando desmineralizada possuía propriedades osteocondutoras e osteoindutoras. Como tal, o processo de desmineralização da dentina passou a ser considerado relevante para promover a osteogénese, permitindo entre outros fenómenos, a libertação da proteína morfogenética óssea 2.

CONCLUSÃO: Atualmente, existe um consenso entre os autores sobre a eficácia da matriz de dentina desmineralizada na regeneração óssea, no entanto ainda não há concordância sobre qual seria o melhor protocolo para favorecer a ação osteoindutora da BMP-2.

PALAVRAS-CHAVE: *Autogenous tooth bone graft, demineralized dentin matrix.*

ABSTRACT

INTRODUCTION: Dental extraction is one of the most performed clinical procedures in the field of dentistry and its consequences are well documented in the literature. To avoid a significant bone loss and to not compromise the future area to be rehabilitated, bone graft materials have been developed. Recently, demineralized dentin matrix has been studied as a potential graft material mainly due to the presence of BMP-2 in its composition.

OBJECTIVE: Study the regenerative capacity of the demineralized dentin matrix as well as to try to clarify the function of bone morphogenetic protein 2 in this process.

MATERIALS AND METHODS: In order to carry out this study, a bibliographic research was carried out in the PubMed® database (National Biotechnology Information Center, National Library of Medicine of the USA) with the following keywords: “Autogenous dental bone graft” and “Demineralized dentin matrix”. The research included all types of articles and was limited to the last 10 years (2010-2020) and the languages included were Portuguese, English, French and Spanish. 40 of 289 articles were selected based on the title and abstract.

RESULTS: Several studies have recognized the similarity of the dentin matrix to the autologous bone, because it has ideal characteristics for bone formation, proving its usefulness as graft material. It was found that the non-demineralized dentin matrix induced less bone formation, as it has a mineral composition and high crystallinity, and low porosity, which interferes with the migration, connection and proliferation of vascular and mesenchymal cells. On the other hand, it was found that the dentin matrix (from autogenous or allogeneic teeth) when demineralized had osteoconductive and osteoinductive properties. As such, the dentin demineralization process has come to be considered relevant to promote osteogenesis, allowing, among other phenomena, the release of bone morphogenetic protein 2 with its osteoinductive properties.

CONCLUSION: Currently, there is a consensus throughout literature regarding the efficacy of the demineralized dentin matrix in bone regeneration, however there is still no agreement on which protocol could enhance the BMP-2 osteoinductive action.

KEYWORDS: Autogenous dental bone graft; demineralized dentin matrix.

The aim of argument, or of discussion, should not be victory, but progress.

Joseph Joubert

AGRADECIMENTOS

Ao Senhor Professor Doutor João Carlos Antunes Sampaio Fernandes, orientador da minha tese de Mestrado em Reabilitação Oral, gostaria de agradecer pelo acompanhamento ao longo do meu ciclo de estudos, por tudo o que me ensinou, pela sua vasta experiência clínica e académica que me transmitiu.

À Senhora Professora Doutora Inês Sansonetty Gonçalves Corte-Real, coorientadora da minha tese de Mestrado em Reabilitação Oral, gostaria de agradecer toda a ajuda, dedicação e horas despendidas na supervisão e revisão dos meus trabalhos para que o teor dos mesmos fossem o mais elevado quanto possível.

À Senhora Professora Paula Vaz, pelo seu gosto pela inovação, pela dedicação no desenvolvimento de novos projetos, por me incluir nesta linha de investigação e por todo o apoio técnico que me concedeu, os meus agradecimentos.

Aos meus pais e irmãs, que me apoiaram desde o início até esta etapa da minha vida profissional e académica, não poderia deixar de tecer um obrigado.

Ao André e aos meus colegas de curso, por tornarem esta jornada ainda mais agradável, memorável e enriquecedora o meu sincero obrigado.

MEMBROS DO CONSELHO CIENTÍFICO DA FACULDADE DE MEDICINA DENTÁRIA DA UNIVERSIDADE DO PORTO

Doutor Álvaro Amadeu Ferreira de Azevedo, Professor Auxiliar

Doutor Américo dos Santos Afonso, Professor Catedrático

Doutora Ana Paula Macedo Coelho Augusto, Professora Auxiliar

Doutora Ana Paula Mendes Alves Peixoto Norton, Professora Auxiliar

Doutor António Marcelo de Azevedo Miranda, Professor Auxiliar

Doutor César Fernando Coelho Leal da Silva, Professor Associado com Agregação

Doutor Filipe Poças de Almeida Coimbra, Professor Auxiliar com Agregação

Doutor Germano Neves Pinto da Rocha, Professor Associado

Doutora Inês Alexandra Costa Morais Caldas, Professora Associada com Agregação

Doutora Irene Graça Azevedo Pina Vaz, Professora Associada com Agregação

Doutor João Carlos Antunes Sampaio Fernandes, Professor Catedrático

Doutor José António Macedo de Carvalho Capelas, Professor Associado com Agregação

Doutor José Mário de Castro Rocha, Professor Auxiliar

Doutora Maria Benedita Almeida Garrett Sampaio Maia Marques, Professora Auxiliar com Agregação

Doutora Maria Cristina Pinto Coelho Mendonça de Figueiredo Pollmann, Professora Associada com Agregação

Doutora Maria de Lurdes Ferreira Lobo Pereira, Professora Auxiliar

Doutora Maria Helena Guimarães Figueiral da Silva, Professora Catedrática

Doutora Maria Helena Raposo Fernandes, Professora Catedrática

Doutor Mário Jorge Rebolho Fernandes da Silva, Professor Catedrático

Doutor Mário Ramalho de Vasconcelos, Professor Associado com Agregação

Doutor Miguel Fernando da Silva Gonçalves Pinto, Professor Catedrático

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela I - Critérios de inclusão e exclusão da pesquisa bibliográfica.....	3
Tabela II - Esquema da pesquisa bibliográfica efetuada na base de dados PUBMED®	4
Tabela III - Resumo das características de cada material de enxerto	6
Tabela IV – Protocolos de desinfecção e desmineralização	15
Tabela V - Estudos comparativos dos vários enxertos ósseos.....	24

ABREVIATURAS E SIGLAS

IGF-1 e 2: Fator de crescimento semelhante a insulina tipo 1 e 2

PDGF: Fator de crescimento derivado das plaquetas

FGF: Fator de crescimento fibroblástica

TGF- β : Fator de transformação de crescimento β

BMP-2: Proteína morfogenética óssea 2

MDD: Matriz de dentina desmineralizada

PNC: Proteína não colagénica

rhBMP-2: Proteína morfogenética óssea 2 recombinante humana

ACS: Esponja reabsorvível de colagénio

HA: Hidroxiapatite

HNO₃: Ácido cítrico

NaOH: Hidróxido de sódio

PCR: Reação em cadeia de polimerase

ALP: Fosfatase alcalina

CONTEÚDO

RESUMO.....	II
ABSTRACT	III
ÍNDICE DE TABELAS.....	VII
INTRODUÇÃO.....	1
MATERIAL E MÉTODOS	3
RESULTADOS	5
1. Características de um Enxerto Ósseo.....	5
2. Composição da dentina	6
3. Importância e função da proteína morfogenética óssea 2.....	8
4. Função e utilidade da rhBMP-2.....	10
5. Protocolos de desmineralização e desinfecção	13
6. Particulado ou bloco e suas aplicações	20
7. Importância do tamanho e espaçamento das partículas	21
8. Estudos comparativos entre a MDD e outros tipos de enxertos	23
9. Proposta de um estudo.....	28
CONCLUSÕES.....	31
BIBLIOGRAFIA.....	32
ANEXOS.....	35

INTRODUÇÃO

A extração dentária constitui um dos procedimentos mais frequentes na área da medicina dentária, encontrando-se as consequências deste ato médico bem documentadas na literatura científica (1). Entre estas destaca-se a ocorrência de uma reabsorção da crista alveolar podendo atingir valores de 2.6 a 4.6mm de largura e de 0.4 a 3.9mm de altura (2, 3). A perda da crista alveolar é significativa nas oito primeiras semanas (4) podendo atingir os 50% nos primeiros seis meses e apresentando um valor médio aproximadamente de 0.5 a 1.0% a cada ano (5). Para evitar esta perda óssea significativa e não comprometer a futura zona a reabilitar, vários materiais de enxerto ósseo têm sido desenvolvidos (6).

A primeira regeneração óssea com osso autólogo foi realizada por Boyne em 1960. Enquanto a primeira elevação do seio maxilar para colocação de implantes em lâmina ocorre mais tarde nos anos 70. Posteriormente, com a introdução dos implantes com formas semelhantes as raízes, a necessidade de realizar procedimentos de regeneração óssea aumentou. Neste contexto, o fosfato tricálcico surge como a primeira alternativa de sucesso ao enxerto ósseo (7, 8).

Durante anos os dentes extraídos foram considerados “lixo biológico”, no entanto, em 1967, alguns investigadores dedicaram-se ao estudo das propriedades indutoras da dentina na formação de osso (9, 10) sendo Urist um dos primeiros a referir-se a osteocondutividade da dentina (5, 11). A este propósito, em 1975, destaca-se a primeira regeneração com dentina desmineralizada alogénica descrita na literatura científica (10). Contudo, só em 2003, Murata *et al*, apresentaram o primeiro caso clínico de sucesso de regeneração óssea autóloga com recurso a dentina humana (12). O sucesso verificado com este caso foi atribuído à semelhança da composição da dentina ao osso (2, 10, 13).

A partir deste momento os dentes autólogos passaram a ser considerados um possível material de enxerto vantajoso na prática clínica devido às suas potencialidades no processo de formação óssea, mas também devido a uma resposta biológica diminuída resultante da sua homogeneidade genética. Este material pode ser utilizado em bloco ou sob a forma de partículas em função do objetivo pretendido (6).

Relativamente à composição da dentina, este material pode ser classificado em função do grau de desmineralização: dentina não mineralizada, matriz de dentina parcialmente desmineralizada e matriz de dentina totalmente desmineralizada (14). Entre estas a dentina desmineralizada parece mostrar-se mais eficaz no processo de

regeneração óssea (15), pois neste estado verifica-se o aumento da biocompatibilidade da matriz associada às proteínas não colagénicas essenciais para a regeneração óssea (4, 15, 16).

De uma forma mais prática, a biocompatibilidade é constatada nos casos onde uma raiz é deixada de forma intencional, para prevenir a reabsorção óssea, ou nos casos de odontosseção nos terceiros molares e onde a porção que fica mais perto do nervo alveolar inferior é mantida para evitar lesão nervosa. Neste tipo de situações, não existindo nenhum sinal de infeção, os osteoclastos aparecem na polpa que será substituída por osso seguido de uma reabsorção radicular. No fim deste processo o remanescente começa a se fundir com o osso alveolar (17).

Desta forma, o principal objetivo deste trabalho é investigar a capacidade regeneradora da matriz de dentina desmineralizada, bem como tentar esclarecer a função da proteína morfogenética óssea 2 (BMP-2).

MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização desta dissertação foi efetuada inicialmente uma pesquisa bibliográfica com os termos MeSH (Medical Subject Headings), na base de dados PubMed® (National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine) com as seguintes palavras chaves: *Demineralized dentin matrix AND bone regeneration, tooth AND bone regeneration, dentin autograft AND bone regeneration, autologous dentin AND bone regeneration* a qual não identificou nenhum resultado. Como tal, realizou-se uma segunda pesquisa bibliográfica nesta base de dados com recurso às seguintes palavras-chave: *Autogenous tooth bone graft* e *demineralized dentin matrix*. Na referida pesquisa não foi feita qualquer limitação ao tipo de artigos identificados, tendo-se incluído estudos publicados nos últimos 10 anos (de 2010 até 2020) e nos idiomas português, inglês, francês e espanhol.

Os critérios de inclusão e exclusão aplicados encontram-se evidenciados na tabela I.

Tabela I - Critérios de inclusão e exclusão da pesquisa bibliográfica

Critérios de inclusão	Critérios de exclusão
<ul style="list-style-type: none"> • Publicação nos últimos 10 anos (de 2010 - Momento da publicação da dissertação) • Idiomas português, inglês, francês e espanhol • Artigos referentes à temática em estudo (dentina desmineralizada) • Todos os tipos de artigos 	<ul style="list-style-type: none"> • Artigos referentes a regeneração óssea que não abordem a temática em estudo

Dos 289 artigos obtidos, foram selecionados 40 artigos de acordo com a relevância do título e do resumo para a realização desta dissertação (Tabela II).

Tabela II - Esquema da pesquisa bibliográfica efetuada na base de dados PUBMED®

Palavras-chave	Filtros	Resultados	Artigos selecionados pelo título	Sem acesso	Eliminados por resumo	Eliminados por texto	Artigos usados
<i>Autogenous tooth bone graft</i>	10 anos + idiomas selecionados	205	33	5	0	7	21
<i>Demineralized dentin matrix</i>	10 anos + idiomas selecionados	84	32	12	0	1	19

Adicionalmente foram incluídos 13 artigos citados na lista dos artigos selecionado por abordarem a temática em estudo.

RESULTADOS

1. Características de um Enxerto Ósseo

A promoção de um mecanismo de cicatrização óssea ideal a partir de materiais de enxerto depende principalmente de três fatores: osteogênese (promoção da formação de osso); osteoindução (recrutamento de células formadoras de osso) e osteocondução (que fornece um esqueleto tridimensional para a orientação da formação óssea) (11, 15, 18). Assim sendo, nestas circunstâncias é essencial a estabilização do coágulo de sangue, a existência de um esqueleto biomecânico para a migração celular, proliferação e diferenciação, a presença de proteínas e péptidos funcionais, como fator de crescimento, e apresentar um adequado mecanismo de remodelação óssea (10).

Os materiais de enxerto disponíveis na prática clínica podem ser classificados como autólogos, alógenos, xenógenos e aloplásticos (14, 18). O material autólogo é considerado o *gold standard* (16, 19) no que diz respeito à reabilitação dos defeitos ósseos por apresentar estas três características possibilitando uma rápida formação óssea, revascularização e biocompatibilidade sem induzir resposta imune (11, 20). No entanto, apresenta como desvantagens a necessidade de criação de uma segunda ferida cirúrgica, uma recolha quantitativa limitada (20-22) e uma reabsorção óssea que poderá ir além dos 50%. Estas condicionantes levaram ao desenvolvimento e procura por outras alternativas de enxerto ósseo (4, 11, 13, 14, 19, 23, 24). Os restantes tipos de enxerto também usados na prática clínica apresentam igualmente problemas na resposta do sistema imunitário desencadeando alterações na cicatrização e riscos de inflamação (15, 19) bem como falta de osteoproliferação, risco de transmissão de doenças para os alógenos, e, ausência de osteocondução para os xenógenos e aloplásticos constituídos principalmente por hidroxiapatite (HA) e fosfato tricálcico que têm como única função promover um esqueleto para a osteogênese (11, 15, 18, 20).

Cada material de enxerto pode possuir umas ou várias características essenciais para a formação óssea encontrando-se as mesmas resumidas na Tabela III.

Tabela III - Resumo das características de cada material de enxerto (Fonte: Jin et al.,2016)

Tipo de material	Propriedade		
	Osteogénese	Osteocondução	Osteoindução
Autógenos	√	√	√
Alógenos	√	×	×
Xenógenos	√	×	√
Aloplásticos	×	√	×

Durante a última década foi comprovada a utilidade da matriz de dentina para regenerações ósseas, não só pelo facto de ser o material mais semelhante ao osso, pela sua composição, mas também por possuir as três características ideais para formação óssea (25).

2. Composição da dentina

Vários autores (2, 10, 13) têm descrito a dentina como sendo um material de enxerto de sucesso pela possibilidade de substituir o osso autólogo e contrariar, assim, os problemas deste tipo de materiais. Este sucesso foi atribuído à semelhança da composição da dentina à do osso. A este respeito, a dentina possui 70-75% de uma componente inorgânica, 15-20% de uma componente orgânica e 10% de água. No osso alveolar as proporções são de 65%, 25% e 10% respetivamente (2, 10, 13). A componente orgânica é constituída por 90% de colagénio tipo I, correspondendo os restantes 10% a proteínas envolvidas na calcificação do osso e a fatores de crescimento, tais como a proteína morfogenética óssea 2 (BMP-2) (15, 19, 20) e outras proteínas não colagénicas como as osteopontinas. A BMP-2 foi mencionada em vários artigos por desempenhar uma função primária na regeneração óssea e tendo um papel preponderante na osteoindução da matriz de dentina (13, 15, 17, 26).

As osteopontinas são uma fosfoproteína que contem ácido siálico e que se liga ao cálcio formando uma estrutura tridimensional. Adicionalmente, permitem a osteogénese através da diferenciação precoce dos osteoblastos e favorecendo a reabsorção óssea de modo a permitir a aderências dos osteoclastos.

Por outro lado, proteínas como a osteonectina que se ligam ao colagénio I permitem o processo de mineralização. As osteocalcinas também estão envolvidas na mineralização. Por último, outras proteínas como as sialoproteínas, os proteoglicanos, as proteínas da matriz de dentina 1 e as glicoproteínas mostraram-se essenciais no *turn over* ósseo.

Todas estas proteínas permitem o crescimento celular, proliferação e diferenciação.

O cimento, por apresentar uma componente orgânica muito semelhante a dentina e frequentemente utilizada neste tipo de estudos (17). Além do colagénio e das proteínas não colagénicas, o cimento também apresenta fatores de crescimento fundamentais na osteoindução, como é o caso do fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 e 2 (IGF-1 e IGF-2), o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), o fator de crescimento fibroblástico (FGF) e o fator de transformação do crescimento β (TGF- β) (11, 17, 22).

Por outro lado, a componente inorgânica da dentina é principalmente constituída por fosfato de cálcio de baixa cristalinidade presente sob 4 formas: hidroxiapatite, fosfato tricálcico, fosfato de cálcio amorfo e fosfato octacálcico (2, 9, 14, 15, 24). Esta componente inorgânica é conhecida por ter propriedades osteocondutoras (15).

Em contrapartida, o esmalte por apresentar elevada componente inorgânica mas baixa componente orgânica nem sempre é usado (16). De facto, o esmalte consiste aproximadamente em 96% substância inorgânica e 4% água (17). Mesmo após desmineralização, a análise de superfície por difração de Raio-X mostraram, relativamente à componente inorgânica da coroa e da raiz, presença dos vários tipos de fosfato de cálcio, no entanto o nível de cristalização era maior na coroa (27).

Em termos da composição química mineral, a dentina consiste em 70% de hidroxiapatite do seu peso e volume. Esta forma de fosfato de cálcio por ser uma estrutura de baixa cristalinidade permite a formação óssea como é o caso do enxerto de osso autólogo. Contudo, o esmalte possui numa elevada cristalinidade tornando se difícil a sua decomposição por osteoclastos resultando numa reduzida reabsorção e osteocondutividade (17).

A relevância atribuída à componente orgânica da dentina no mecanismo de regeneração óssea, especificamente ao papel da proteína morfogenética óssea 2, tornam pertinentes os objetivos estabelecidos para este estudo que se desenvolvem nos tópicos seguintes.

3. Importância e função da proteína morfogenética óssea 2

Os primeiros estudos realizados sobre as propriedades indutoras da BMP-2 começaram em 1967 após Urist ter proposto que as BMP-2 da dentina e do osso são estimulantes *major* com propriedades osteoindutoras (5, 9, 11). Em 1991, Bessho *et al.*(28) isolaram pela primeira vez a BMP-2 da matriz de dentina de dentes definitivos, obtendo um valor inferior a 1µg/kg, correspondendo a uma quantidade pequena relativamente ao osso. Recentemente, em 2019, um estudo realizado por Nina Bono demonstrou que em dentes decíduos este valor poderia ser sensivelmente superior atingindo até 1,2± 0,3ng por grama de dentina (29).

A BMP-2 tem como função induzir a diferenciação das células mesenquimais à volta do enxerto. Estas células após indução são então convertidas em condroblastos e osteoblastos para formar novo osso (4, 22).

A matriz de dentina desmineralizada (MDD) pode ser classificada como um enxerto com propriedades indutoras por apresentar precisamente esta BMP-2 que induz a diferenciação de células mesenquimais. Assim, a MDD tem possibilidade de ter propriedades osteogénicas quando é colocada nouro tipo de superfície para além de osso (20, 25).

De uma forma geral a BMP-2 representa 1% de todas as proteínas que formam a MDD, embora não sejam as únicas responsáveis pela formação óssea. A presença de outros fatores de crescimento e proteínas não colagénicas (PNC) são essenciais (20, 30). Num estudo realizado por Um *et al.* (2017) após análise da MDD por eletroforese e *Western blotting* de um terceiro molar foi demonstrada a presença de PNC nos túbulos dentinários mas ausência de BMP-2 (9). Uma justificação plausível sugerida para este achado relaciona-se com a necessidade de existência de um esqueleto para manter a ação da BMP-2 localmente, uma vez que é uma proteína altamente solúvel. A estrutura/esqueleto referido deve idealmente funcionar como um transportador e reservatório para a libertação de BMP-2 controlada para, desta forma, poder prevenir a sua degradação e inativação (25).

A constatação de que quer tecido ósseo, quer tecido dentinário, enquanto mineralizado não conseguem formar osso ectópico, é explicado pela libertação lenta das BMP-2 da matriz mineralizada e pelas suas concentrações baixas não permitirem o nível de diferenciação necessário. Quando o osso ou a dentina são hidrolisados, para remover a parte mineralizada, a quantidade de minerais é reduzida para 5 a 30% e as

BMP (presas pelos cristais de hidroxiapatite) são libertadas rapidamente atingindo concentrações adequadas para induzir osteogénese. Ao contrário do verificado com a dentina mineralizada que só produz osso passado 8 a 12 semanas após o enxerto, por ter uma reabsorção lenta e pouca atuação das PNC (9, 15, 25, 30). Urist foi um dos primeiros investigadores a descobrir que a osso desmineralizado era capaz de formar osso mais facilmente que o não desmineralizado, e, compreendeu, devido às semelhanças entre eles, que o dente tem essa mesma capacidade (11).

Esta propriedade osteogénica não sofre diferenciações consoante o género do indivíduo nem da espécie. Para comprovar isso Kim *et al.* demonstraram que a MDD quando colocada em músculo do modelo animal rato conseguia criar osso, para além de atribuírem esta capacidade principalmente à ação da BMP-2 (25, 30). Neste estudo animal verificou-se a presença de fibroblastos e vasos sanguíneos junto das partículas da MDD após duas semanas do enxerto. Posteriormente, às quatro semanas o tecido fibroso já estava bem organizado, tendo-se confirmado a presença significativa de tecido vascularizado e osteócitos à volta de uma matriz óssea que se formava a partir do particulado. Às oito semanas identificou-se o início da mineralização óssea e a formação de colagénio entre as partículas. O facto de existir formação óssea a partir do particulado e no centro do defeito ósseo é justificado pela ação da BMP-2 da MDD. Na avaliação da progressão deste processo regenerativo a análise histomorfométrica mostrou mais osteoblastos às quatro semanas do que às duas e às oito semanas, sendo este facto atribuído à BMP-2 atuar nas primeiras fases da formação óssea (20).

Como já foi referido a BMP-2 é considerada uma substância quimiotática que induz a migração das células mesenquimais indiferenciadas para a zona do defeito ósseo e a sua diferenciação em condroblastos e osteoblastos, contribuindo para a sua grande importância nos primeiros dias após o enxerto. Pois, numa primeira fase as plaquetas juntam-se na ferida e ativam o processo de supressão da hemorragia e são libertados grânulos na matriz para formar um coágulo de sangue. Os macrófagos entram em ação e passado 7 dias o efeito dos osteoblastos começam-se a notar. A BMP-2 começa a ser secretada em conjunto com a TGF- β , o IGF, e o fator de crescimento dos fibroblastos. Estes fatores permitem a diferenciação das células mesenquimais em osteoblastos. Na fase inicial de formação óssea as células formadas pelos osteoblastos são ossificadas e tornam-se em tecido ósseo. No entanto, tratando-se ainda de um osso imaturo esta fase representa uma das mais importantes na cicatrização. Numa fase final, ocorre a calcificação do osso formando-se um osso lamelar que se torna, assim, numa superfície mais resistente (20).

Por se apresentar em quantidades mínimas na dentina a *Food and Drug Administration* (FDA) aprovou a utilização de uma BMP exógena, a proteína morfogenética óssea 2 humana recombinante (rhBMP-2), para aumentar ainda mais a capacidade osteoindutora do enxerto (5, 17).

4. Função e utilidade da proteína morfogenética óssea 2 humana recombinante

Depois da descoberta feita por Urist sobre as propriedades da BMP-2 endógena, a FDA aprovou em 2007 o uso de uma proteína exógena, a rhBMP-2, numa concentração de 1.5mg/mL. Contudo, como qualquer outro fator de crescimento, esta proteína para atuar necessita de um transportador, correspondendo o fosfato de cálcio como a hidroxiapatite ou o fosfato β tricálcico (β -TCP) bons candidatos devido às suas propriedades estruturais. Entre estes dois compostos o fosfato de cálcio bifásico parece ser mais vantajoso por possuir uma proporção entre hidroxiapatite e β -TCP favorável resultando na melhoria das suas propriedades osteocondutoras. No entanto, a FDA só aprovou o uso de rhBMP-2 com uma esponja reabsorvível de colagénio (ACS). Este produto muito usado na área da cirurgia maxilofacial, foi aconselhado nos casos de uma elevação do seio maxilar e preservação da bolsa alveolar. No entanto, algumas complicações como a formação de edema e formação óssea heterotópica foram descritas. Em contrapartida, alguns estudos não verificaram complicações quando a dose era reduzida para um quarto ou metade da aprovada pela FDA (5, 26, 31).

Para além da problemática da definição de uma concentração adequada, um outro problema que se colocou foi o de se criar uma forma de controlar a libertação da rhBMP-2, passando a resolução do mesmo pelo uso de um agente de libertação lento, como a hidroxiapatite e outros componentes como o fosfato tricálcico e o colagénio, permitindo assim uma formação óssea gradual e local (5).

Em 1998 foi sugerido que a dentina desmineralizada fosse utilizada como transportadora por induzir a formação de osso novo no periodonto, tendo-se confirmado em 2005 que a MDD podia efetivamente ter este papel. Como a dentina é principalmente constituída por colagénio tipo I e hidroxiapatite poderá ser mais vantajosa que a esponja de colagénio (31).

Estudos posteriores demonstraram que a matriz dentina desmineralizada funcionava melhor que a mineralizada, por ter uma liberação de rhBMP-2 mais lenta e maior.

Um *et al.* (2019) relataram vários problemas relacionados com a aplicação da rhBMP2/ACS, sendo o edema a reação adversa mais comum. Contudo, outros problemas poderão estar associados ao seu uso, como o hematoma, a deiscência, a infecção, dor ou a formação ectópica de osso (32). Esta formação de osso ectópica ocorre sobretudo porque a dose é muito elevada em relação à BMP-2 endógena, quase 10^6 vezes superior e pela esponja não ter capacidade de manter a concentração no local. Como as esponjas de colagénio possuem uma reabsorção rápida, a esponja liberta quase 50% das proteínas nas primeiras 60 horas e quase a totalidade nos primeiros 14 dias (17, 26, 32).

Para ultrapassar este problema vários possíveis transportadores foram estudados. A MDD mostrou ter capacidade osteocondutor em estudos *in vivo*, *in vitro* e em estudos clínicos. Para além do exposto, este material poderá ser um transportador viável devido à sua estrutura mecânica estável e pelas suas propriedades. A dentina é um estrutura ácido-insolúvel, acelular, avascularizada, constituída por colagénio tipo I com nanoporos (túbulos dentinários) que contêm minerais e proteínas não colagénicas incluindo-se os fatores de crescimento. Para além disso, como já referido, a dentina possui 4 tipos de fosfato de cálcio com baixa cristalinidade permitindo assim uma maior solubilidade. Esta capacidade biodegradável em condições fisiológicas permite a liberação de fatores de crescimento, tal como a BMP-2 através dos túbulos dentinários de uma forma lenta e controlada (26).

Para verificar a eficácia da MDD Um *et al.* (2016) (31) realizaram um estudo comparativo entre três amostras: uma só com MDD (grupo 1), outra com ABB (*anorganic bovine bone*) + rhBMP (grupo 2) e MDD+rhBMP2 (grupo 3). Às duas semanas, no grupo 1, foi possível observar osteócitos e angiogénese. No grupo 2 verificou-se a presença de osso e à volta do ABB muito tecido conjuntivo denso. No grupo 3 a atividade celular e vascular foi semelhante ao do osso. No grupo 1 às 8 semanas houve formação de osso no espaço intersticial com tecido conjuntivo a preencher. No grupo 2 não foi visível a reabsorção do ABB, no entanto houve muita formação óssea. No grupo 3 foi identificado a existência de uma relação íntima entre enxerto e o osso. Os autores deste estudo concluíram, assim, que a junção entre a MDD+rhBMP2 favorecia a formação óssea relativamente aos outros grupos, pois o colagénio já conhecido por ser um transportador da rhBMP-2, está presente no MDD com a HA permitindo obter uma

integridade estrutural e propriedades mecânicas favoráveis para a ação da rhBMP-2. A MDD representa assim um bom candidato substituto a matriz de colagénio. Para além disso, os túbulos dentinários permitem uma ligação do rhBMP-2, bem como a secreção endógena da BMP-2 (17, 23, 31).

Em 2019 realizou-se um outro estudo comparativo entre a aplicação de MDD+rhBMP-2 com a MDD isoladamente para a preservação de um alvéolo pós-extracional. Neste estudo a rhBMP-2 foi utilizada numa concentração de 0.2mg/mL nas seguintes proporções de 5.0µg de rhBMP-2 para 0.3g de MDD. Constatou-se uma menor perda óssea em altura e em largura no grupo da MDD+rhBMP-2, bem como uma maior percentagem de formação óssea (5).

Relativamente a esta temática e tendo em consideração uma revisão de estudos histológicos a este respeito verifica-se que a quantidade de formação óssea com a MDD+rhBMP-2 é maior do que quando considerada a MDD isoladamente. Sendo que as características histológicas mais relevantes identificadas com a aplicação da MDD+rhBMP-2 foram: a formação precoce de osso por atividade osteoblástica na superfície do MDD, a reabsorção osteoclástica rápida da dentina de matriz e o alargamento dos túbulos, e, a substituição das lacunas da dentina por osso novo (5).

Estudos clínicos com uma dose de 0.2mg/mL de rhBMP-2 obtiveram bons resultados no que diz respeito a formação óssea mesmo sendo uma concentração inferior a outros estudos. No entanto, no estudo de Um *et al.* (2019) (5) não encontraram valores estatisticamente significativos quando compararam a regeneração óssea com MDD unicamente *versus* MDD+rhBMP-2 a 0.2mg/mL, não obstante a percentagem de regeneração óssea era maior no segundo grupo. Fiorellini *et al.*(33) avaliaram também a eficácia da rhBMP-2 comparando duas concentrações diferentes, uma de 0.75mg/mL e outra de 1.5mg/mL, sendo que a segunda concentração mostrou quase o dobro da regeneração óssea. Com os resultados atualmente referidos na literatura científica é sugestivo que a utilização da MDD como transportadora poderá ser possível a redução da quantidade de rhBMP-2, pois a MDD contém outros fatores de crescimentos fundamentais para a formação óssea o que permitirá evitar efeitos secundários com doses elevadas de rhBMP-2 (5, 26).

5. Protocolos de desmineralização e desinfecção

Um dente mineralizado não consegue induzir tão facilmente a formação de osso novo, uma vez que a composição mineral e a cristalinidade elevada, e, a baixa porosidade interferem na migração, ligação e proliferação das células vasculares e mesenquimais. O reconhecimento deste achado permitiu constatar o mesmo para dentes autólogos ou alogénicos, os quais neste estado apresentam melhores propriedades osteocondutoras e osteoindutoras. Consequentemente, a desmineralização passou a ser considerada um passo importante para a osteogénese (11).

A este propósito, no estudo *in vitro*, de Koga *et al.* (13) os resultados obtidos coadunam-se com o referido, verificando-se que a dentina quando parcialmente desmineralizada tinha mais capacidade regenerativa que a dentina não desmineralizada. Isto parece se justificar pelo facto da dentina desmineralizada favorecer a osteoindução ao expor as substâncias orgânicas que estavam contidas na estrutura dentária, aumentando a porosidade, superfície de contacto e diminuindo a cristalinidade (15).

Apesar de tudo, um dos problemas da desmineralização é a exposição prolongada aos agentes externos, o que pode afetar negativamente as PNC envolvidas na formação de osso (16).

Ainda relativamente à aplicação de dentina desmineralizada Kim *et al.* (2014) ao abordarem as respetivas vantagens da utilização da mesma em ambiente clínico destacam o tempo de consumo da dentina desmineralizada nestes casos ser de mais ou menos 2 a 6 dias. Enquanto os que apresentam um tempo de consumo de várias semanas tornam-se inviáveis, para além da dentina desmineralizada exposta durante muito tempo aos agentes desmineralizantes poderem afetar negativamente as PNC (10).

Da literatura científica disponível sobre este tema Koga *et al.* (13) parecem ser os únicos investigadores a explicar a diferença entre a desmineralização parcial e a total. Para o desenvolvimento deste estudo foi medido a quantidade de cálcio remanescente durante a desmineralização, a concentração de cálcio diluído na solução e a do cálcio residual na dentina. Os resultados obtidos sugerem que a desmineralização depende do tamanho da partícula. No estudo mencionado a

desmineralização foi feita com 2% de ácido nítrico (HNO_3) com tempos distintos de atuação consoante o tamanho das partículas. Assim sendo para obter uma desmineralização parcial de 70% foram aplicados tempos de 5, 10 e 20 minutos, e, para uma desmineralização total foram aplicados tempos de 60, 120 e 180 minutos para partículas de 200, 500 e 1000um respetivamente (13).

Na literatura científica (4, 5, 7, 10, 13, 14, 19-21, 23, 24, 32, 34-37) existem vários protocolos de desmineralização descritos, sendo o protocolo *da Korea Tooth Bank* e o protocolo da *Smart Dentin Grinder* os mais relatados. Segundo Koga *et al.* a diferença entre uma desmineralização parcial e total deve-se ao tempo de exposição ao agente desmineralizante em função do tamanho da partícula. Neste estudo concluíram que quanto maior forem as partículas, maior é a formação óssea, pois as partículas menores são reabsorvidas antes da formação de osso. Para além disso verificaram que a desmineralização parcial promove maior formação óssea que a desmineralização total devido ao facto que ao longo da desmineralização há perda das proteínas (13).

Os protocolos descritos e resumidos na tabela IV não se encontram completos, no entanto existem pontos em comum em quase todos os protocolos, como é o caso da lavagem, desidratação, desengorduramento, desmineralização, liofilização e esterilização. Porém, como é possível constatar entre os inúmeros estudos os protocolos não são uniformes e, por isso, não reprodutíveis.

Tabela IV – Protocolos de desinfecção e desmineralização

Autor	Ano	Artigo	Preparação dos dentes				Protocolo					
			Raiz	Coroa	Bloco	Particulado	Lavar	Desidratar	Desengordurar	Desmineralizar	Liofilizar	Esterilizar
Kim <i>et al</i> (14)	2014	<i>Research</i>	x			x	NaOH +H ₂ O	Álcool etílico	Éter de etileno	30min 0.6N HCl	SD	Gás óxido de etileno
							Korea Tooth Bank Protocol					
Jun <i>et al</i> (19)	2014	<i>Clinical cases</i>	x	x		x	Korea Tooth Bank Protocol					
Kim <i>et al</i> (10)	2014	<i>Cases series</i>	x		x	x	Korea Tooth Bank Protocol					
Kim (16)	2015	<i>Clinical cases</i>			x		SD	NA	NA	SD	NA	NA
							VacuaSonic® and DecalSi-DM®; Cosmobiomedicare Protocol					
Kim <i>et al</i> (38)	2014	<i>Clinical cases</i>	x	x	x	x	SD	SD	SD	SD	SD	SD
Lee <i>et al</i> (34)	2015	<i>Technical note</i>	x		x		Korea Tooth Bank Protocol					
Lee <i>et al</i> (8)	2013	<i>Case study</i>	x	x		x	NaCl	NA	CH ₃ Cl 2°C 30min	HCl 2°C 30min	NA	NA

Regeneração óssea e atuação da BMP-2 na desmineralização da matriz de dentina

Calvo-Guirado <i>et al</i> (7)	2018	<i>Experimental study</i>	x	x		x	NaOH	NaOH+ Álcool etílico 10min	PBS 3min	EDTA 2min	NA	NA
							Smart Dentin Grinder Protocol®					
Canto Dias <i>et al</i> (4)	2019	<i>Pilot study</i>	x	x		x	Smart Dentin Grinder Protocol®					
Kim (20)	2014	<i>Experimental study</i>	x	x		x	Korea Tooth Bank Protocol					
Koga <i>et al</i> (13)	2016	<i>Research</i>	x	x		x	0,1M Tris- HCl pH7,4 10min			2% HNO3	SD	SD
Um <i>et al</i> (5)	2018	<i>Case series</i>	x			x	Korea Tooth Bank Protocol					
Kim <i>et al</i> (35)	2014	<i>Retrospective study</i>	x	x		x	Korea Tooth Bank Protocol					
Nam <i>et al</i> (22)	2016	<i>Research</i>	x	x		x	NaOH+ H ₂ O ₂	Álcool etílico	Éter de etileno	15h em HCl e 120min Tris-HCl	SD	Gás óxido de etileno
UM <i>et al</i> (31)	2016	<i>Research</i>	x	x		x	H ₂ O ₂	Álcool etílico	Éter de etileno	0,6N HCl 2h	SD	SD

Regeneração óssea e atuação da BMP-2 na desmineralização da matriz de dentina

Oliveira <i>et al</i> (39)	2013	Research	x			x	NaOH 10min	SD	SD	10% EDTA (Ph 7,2) 3 meses	SD	SD
Kim <i>et al</i> (23)	2017	Clinical study	x			x	Korea Tooth Bank Protocol					
Kim <i>et al</i> (37)	2017	Case report	x		x		Korea Tooth Bank Protocol					
Parvini <i>et al</i> (40)	2018	Research	x		x		NA					
Calvo Guirado <i>et al</i> (36)	2019	In vitro Study	x	x		x	Smart Dentin Grinder Protocol®					
Kim <i>et al</i> (3)	2015	Clinical cases	x	x	x	x	Tecnologia ultrassônica com pressões negativas periódicas e controlo de temperatura					
Jin <i>et al</i> (11)	2016	Research	x	x		x	H ₂ O ₂	SD	SD	2% HCl + solução salina	SD	SD
Kim <i>et al</i> (24)	2014	Clinical cases	x	x	x	x	Korea Tooth Bank Protocol					
Kim <i>et al</i> (21)	2013	Clinical cases	x	x	x	x	Korea Tooth Bank Protocol					
Nampo <i>et al</i> (18)	2010	Research	x	sem esmalte		x	SD					

Regeneração óssea e atuação da BMP-2 na desmineralização da matriz de dentina

Jeong <i>et al</i> (41)	2011	<i>Clinical study</i>	x	x		x	SD					
Um <i>et al</i> (32)	2019	<i>Research</i>	x	x		x	Korea Tooth Bank Protocol®					
Wlodarski <i>et al</i> (30)	2013	<i>Research</i>					SD	SD	SD	0.6N CHI 5h	SD	SD
Bakhshalian <i>et al</i> (25)	2013	<i>Pilot study</i>	x	x		x	H ₂ O + álcool etílico 70%	SD	SD	0.6mol/L HCl 7 dias	SD	SD
Kabir <i>et al</i> (42)	2017	<i>Research</i>	sem 2mm apicais	sem esmalte	x		H ₂ O	SD	SD	0.34N HNi ₃ 30min	SD	SD
Bakhshalian <i>et al</i> (43)	2013	<i>Research</i>	x	x		x	NaOH + álcool etílico a 70%			0.6mol/L HCl 7 dias		

*SD – Sem dados NA – Nada a assinalar

Para diminuir o risco de infecções ou reações imunitárias vários tipos de desinfecções têm vindo a serem testadas. O álcool, acetona, formalina e beta propiolactona são desinfetantes químicos, no entanto estes produtos podem-se disseminar no corpo quando aplicados em concentrações altas o que aumenta a probabilidade de toxicidade. Daí serem utilizados como desinfetantes de superfície. Por sua vez, o glutaraldeído e o formaldeído são desinfetantes alcalinos que destroem a capacidade osteoindutora do osso descalcificado. A este respeito, Voggenreiter *et al.*(44) verificaram que esterilização em autoclave mudava a matriz de celulose do osso calcificado, o que reduziria a estabilidade biológica e a osteoindução. Este procedimento, segundo Woodard *et al.* (45) influencia a osteocondução, aderência e movimentos dos osteoblastos. Enquanto para Kohler *et al.*(46) a realização do mesmo associa-se a uma diminuição da força de ligação no tecido ósseo (11).

Relativamente ao gás de óxido de etileno, Kaye e Philips (47) confirmaram ser um método efetivo, ideia que foi apoiada por outros investigadores por não haver evidência científica do mesmo não provocar alterações na osteoindutividade nem na osteogénese. Munting *et al.* (48) demonstraram que utilizando óxido de etileno a capacidade osteogénica poderia ser reduzida, sendo este facto concordante com o estudo de Pekkarinen *et al.* (11, 49).

No estudo de Jin *et al.*, em 2016, comparou-se a esterilização com o gás de óxido de etileno e com o autoclave. No que diz respeito ao contacto osso/implante verificaram que este foi menor quando foi esterilizado em autoclave numa fase mais precoce, aumentando ao longo das semanas. No que diz respeito ao *ratio* de formação óssea, a esterilização em autoclave mostrou valores inferiores à esterilização com gás de óxido de etileno. No entanto, em nenhum dos grupos (sem esterilização do enxerto, esterilização em autoclave e com gás de óxido de etileno) houve falha do implante (11).

Calvo-Guirado *et al.* demonstraram que o etanol a 70% desnatura, precipita as proteínas e é bactericida. Para evitar a perda de muitas proteínas essenciais na osteogénese, usou-se uma solução de etanol e de hidróxido de sódio (NaOH). Assim, é permitida uma ação do etanol unicamente na superfície das partículas sem deixar de atuar como desinfetante. Desta forma o colagénio aprisionado na componente mineral não é desnaturado deixando o NaOH atuar de forma mais interna (7). Este protocolo vai de encontro com o protocolo do Smart Dentin Grinder®, onde o desinfetante da dentina que é uma solução alcalina que combina um etanol e um hidróxido de sódio tem capacidade de remover bactérias, vírus e fungos. Contudo, o mesmo não é considerado para os priões. Em todos os casos, por ser um enxerto autólogo, afirmam não apresentar

problemas e não haver necessidade de realizar processamento por se tratar de um autotransplante. (36)

A maioria dos estudos realizados têm sido feitos com dentes autólogos. Alguns autores descreveram a possibilidade de usar MDD para familiares diretos. A este propósito, Kim *et al.*, publicaram em 2014, dois casos clínicos com o uso de dentes de familiares diretos, especificamente filhos. Estes autores defendem que a reação imunitária após enxerto com dentes alogénicos entre pais e filhos, e, entre irmãos, tem uma reação imunitária tardia ou reduzida se os antígenos de histocompatibilidade (antígeno H) forem compatíveis. Sem serem muito pormenorizados em termos protocolares referiram que os dentes foram preservados, tratados e armazenados. Esta estratégia adotada foi sugerida só funciona entre pais, filhos e irmãos, podendo se utilizar para o efeito dentes definitivos ou decíduos. Os doadores são submetidos a testes de doenças venéreas e, se o dador e recetor o desejaram, testados ao vírus de imunodeficiência (38). Outros casos clínicos descritos que seguem um protocolo distinto, do AutoBT®, obtiveram sucesso na regeneração óssea. Mais se acrescenta que o banco de dentes da Coreia do Sul, que aplica este protocolo, realiza testes microbiológicos após cada processamento (19, 34).

6. Particulado ou bloco e suas aplicações

A dentina autóloga pode ser utilizada em duas formas, em bloco ou particulado. O bloco é mais utilizado nos casos de preservação alveolar, regeneração óssea guiada e aumento vertical da crista alveolar. Representa uma estrutura biomimética do osso cortical, por já apresentar microporos de 3 a 5 µm e onde é possível realizar macroporos na estrutura tridimensional de 0.2 a 0.3mm para permitir a invasão dos vasos sanguíneos e uma substituição contínua do enxerto (34, 37). De facto, o bloco de MDD pode estar dependente da acessibilidade e quantidade de supressão sanguínea, daí a importância da realização de macroporos. Isto poderá justificar o facto de existir menos reabsorção óssea à volta do implante na maxila, por nesta zona o osso ser mais esponjoso e mais vascularizado (37).

Quando o bloco é utilizado, isto é, apenas a parte radicular, existe alguma reabsorção óssea, embora reduzida, após a cicatrização. Fenómeno justificado pelo facto de ser fosfato de cálcio de baixa cristalização (10).

A dentina particulada também pode ser utilizada em conjunto com o bloco como nos vários estudos realizados por Kim *et al.* (10, 24, 38), ou poderá ser utilizada sozinha. O uso da dentina particulada foi descrito em várias situações como, por exemplo, em aumentos verticais e horizontais (3), preservação alveolar (4, 39) e elevações do seio maxilar (19, 41).

7. Importância do tamanho e espaçamento das partículas

Calvo Guirado *et al.* (36) descreveram que os dois fatores mais importantes para a atividade e velocidade de formação óssea é o tamanho das partículas e a composição do material de enxerto. Um material de substituição óssea deve funcionar de um modo bimodal, isto é, numa fase precoce da diferenciação permitir que os osteoblastos criem pontes entre as partículas e interajam com outros osteoblastos. A formação de osso novo é estimulada pela ativação de células estaminais mesenquimais. No fim, o objetivo é ter uma união completa entre as células diferenciadas, o que dará suporte à produção de uma matriz óssea. Para tal, o material deve ser constituído por uma estrutura porosa com macro, micro e nanoporos. O material de regeneração óssea deve ter uma configuração tridimensional para maximizar a adesão e função celular. Esta superfície porosa permite a colonização celular e a entrada de vasos sanguíneos (22, 36). Também deve possuir uma porosidade suficiente para a adesão e proliferação dos osteoblastos, assim como espaço suficiente para o suprimento de nutrientes. Quanto maior a área de contacto, maior será a permeabilidade dos fluídos e, conseqüentemente, mais fácil será a formação óssea (22).

Similarmente pode ser destacado na literatura o estudo de Nam *et al.* que decidiram realizar uma comparação da regeneração óssea com MDD com diferentes pesos e densidades. Estes autores constataram que a distância de 200µm entre partículas de 0.25 a 1.0mm permite uma melhor formação óssea (22). Os resultados obtidos vão de encontro com a investigação de Koga e colaboradores, na qual se verificou que quanto maior for a partícula, maior a indução de formação de osso novo. No entanto, para todos os tamanhos de partículas de dentina parcialmente desmineralizada, existia formação óssea sobretudo na 8ª semana. As partículas de dentina não desmineralizadas mantinham-se presentes independentemente do tamanho da mesma. Quando havia início da formação óssea, principalmente na 4ª e 8ª semana, a formação óssea mantinha-se à volta das partículas unicamente, exceto para os tamanhos de partículas

de 1000 μ m em que foi possível ver formação óssea noutros locais. Na dentina não desmineralizada existia pouca presença de células geradoras do *turn over* ósseo. No caso da dentina parcialmente desmineralizada, foi possível observar, à volta das partículas, formação óssea com tecido conjuntivo e osteóides, na 4ª semana, sobretudo nas partículas de 1000 μ m. No final da 8ª semana verificou-se um encerramento completo do espaço entre as partículas e a formação óssea. No caso da dentina completamente desmineralizada chegou-se às mesmas conclusões, existindo uma boa formação óssea nas partículas de 1000 μ m logo na 4ª semana. Na 8ª semana foi possível observar uma boa formação óssea, com quase substituição total das partículas por osso novo ao contrário das partículas de 200 μ m e 500 μ m, pois alguma matriz tinha sido reabsorvida e substituída por tecido conjuntivo sobretudo nas partículas de 200 μ m. Na dentina não desmineralizada verificou-se um número reduzido de osteoblastos ligados à superfície das partículas, ao contrário do verificado na dentina desmineralizada

Para além do colagénio, sabe-se que a dentina possui várias proteínas não colagénicas como as BMPs, assim quando a dentina está desmineralizada, os túbulos dentinários adquirem um maior diâmetro permitindo que funcionem como canais para a libertação das proteínas. Relativamente ao tipo de mineralização, como anteriormente referido, é reconhecido que a dentina parcialmente desmineralizada apresenta maior atividade regenerativa do que a dentina completamente desmineralizada, sobretudo nas fases iniciais. Uma possível justificação deve-se ao facto da existência de redução do tamanho pela ocupação do espaço remanescente por tecido conjuntivo. Este fenómeno sugere que a reabsorção das partículas ocorre mais rapidamente que a formação óssea, sendo o colagénio principalmente absorvido por enzimas. As presenças de células osteoclásticas foram observadas tanto nos casos de desmineralização parcial, como nos de desmineralização total, mas não nos casos de dentina não desmineralizada. No entanto, existe na mesma formação óssea, porque durante a reabsorção das fibrinas de colagénio existe uma libertação de proteínas formadores de osso. Em todos os casos, partículas maiores independentemente da desmineralização apresentam melhores resultados, pois partículas menores serão reabsorvidas antes de se ter iniciado o processo de formação óssea(13).

A importância das partículas na formação óssea é igualmente defendida por Shapoff *et al.* (50) Quanto a este fator, Bhaskar *et al.* (51) dizem que o tamanho ideal é de 500 μ m e que a distância ideal entre partículas é de 150 μ m, pois se a partícula for muito grande vai demorar mais tempo a ser reabsorvida e se for muito pequena não terá tempo de fazer a sua função antes de ser reabsorvida. Quando o espaço entre partículas é muito

largo é difícil criar um esqueleto para a formação de sangue, se for muito pequeno os vasos não conseguem entrar (18).

Para fazer face a estas condicionantes, o protocolo da Smart Dentin Grinder® permite a formação de partículas de 1200 e 300µm nas seguintes proporções de 80% e de 20%. As partículas menores facilitam a reabsorção rápida e a manutenção do osso, enquanto as partículas maiores reduzem a reabsorção óssea (7).

8. Estudos comparativos entre a MDD e outros tipos de enxertos

Donovan *et al.* (52) e Donos *et al.* (53) compararam a taxa de reabsorção após enxerto de osso ilíaco e osso do crânio tendo verificado que o osso ilíaco tem quase o dobro da reabsorção. A maioria dos ossos, incluindo o osso ilíaco, tem formação óssea endocondrial, ao contrário do osso dos maxilares e do osso alveolar que tem uma ossificação intramembranosa. O ser humano desenvolve-se a partir de várias camadas: ectoderme, mesoderme, endoderme e crista neural. Os tecidos desenvolvidos a partir da crista neural incluem os ossos maxilofaciais (menos o occipital, esfenoide, temporal e etmoide), cartilagem, dentes, nervos e células gliais. A dentina possui fatores de crescimento: IGF, BMP-2 e TGF-β. O cimento contém TGF-β, IGF-I e colagénio tipo I e II. Ambos possuem proteínas comuns ao osso como osteopontina, sialoproteínas, osteocalcina, colagénio tipo I, osterix e bfa1, proteína conhecidas por estarem envolvidas no *turn over* ósseo. Concluíram então que os dentes possuem componentes essenciais na osteogénese como as células indiferenciadas derivadas da crista neural, proteínas envolvidas na formação óssea e fatores de crescimento. Neste artigo compararam-se dois tipos de enxerto, dentes e o osso ilíaco e verificou-se que MDD pode ser um bom substituto para a realização de uma regeneração óssea (18).

Vários estudos foram realizados após a descoberta da MDD com o objetivo de comparar a eficácia com outros tipos de enxerto conhecidos na prática clínica. Os estudos comparativos estão resumidos na Tabela V.

Tabela V - Estudos comparativos dos vários enxertos ósseos

Autor	Ano	Artigo	Espécie	Amostra	Grupos comparativos							Resultados	
					MDD	AutoBT®	Bio-Oss®	HA	Sem enxerto	Osso autólogo	Osteon®		
Jun <i>et al</i> (19)	2014	<i>Clinical cases</i>	Humano	38		X	X						Sem diferenças estatisticamente significativas no que diz respeito à estabilidade primária dos implantes, a largura da crista óssea pós enxerto, densidade óssea e mineral, espessura trabecular. Em ambos os grupos, a densidade passou de D3 a D2. Houve melhores resultados no AutoBT® em relação altura óssea e a espessura trabecular e dos osteoides.
Lee <i>et al</i> (8)	2013	<i>Case study</i>	Porco	5	x			x					Existe maior formação óssea no grupo experimental (MDD). As 12 semanas já existia osso à volta do particulado ao contrário do enxerto com HA onde a formação óssea estava mais restrita aos bordos do defeito ósseo.
Calvo-Guirado <i>et al</i> (7)	2018	Experimental study	Cão	6	x				x				Diferenças estatisticamente significativas na formação óssea. No grupo controlo (sem enxerto) aos 30 dias presença de osso imaturo com aperfeiçoamento na organização aos 90 dias e com osteoides a preencher espaços. No grupo experimental constatou-se a formação óssea irregular com níveis altos de capilaridade e aos 90 dias já tinha osso maduro e cheio de osteoides.

Regeneração óssea e atuação da BMP-2 na desmineralização da matriz de dentina

Canto Dias <i>et al</i> (4)	2019	<i>Pilot study</i>	Humano	6	x				x			Em ambos os casos foram usados uma membrana de colagénio. Houve maior perda óssea no grupo controlo (sem regeneração). Densidade óssea maior no grupo experimental (MDD) mantendo se estável ao longo das 16 semanas de estudo.
Kim <i>et al</i> (35)	2014	<i>Retrospective study</i>	Humano	22		x					x	Não houve diferenças estatisticamente significativas no que diz respeito a reabsorção óssea a volta de um implante após elevação de seio.
Oliveira <i>et al</i> (39)	2013	Research	Rato	16	x				x			Início de cicatrização visível nos dois grupos entre os 5 e 14 dias após a extração. 5 dias após a cirurgia o grupo controlo (sem regeneração) começou a apresentar tecido conjuntivo rico em células inflamatórias e capilares neoformados bem como osteoclastos. No grupo experimental há presença de vasos sanguíneos e novo tecido conjuntivo com um osso imaturo rodeado por osteoblastos e células inflamatórias, que sugere um processo de cicatrização mais avançado. Aos 10 dias o grupo controlo apresentava menos inflamação, osso trabeculado imaturo e tecido conjuntivo enriquecido em células. O grupo experimental não apresenta células inflamatórias, vários trabeculados bem formados conduzido por osteoblastos e tecido conjuntivo bem organizado e algumas células sanguíneas. Depois de 14 dias foi possível ver osso trabeculado nos dois grupos, mas o grupo experimental mais avançado.
Kim <i>et al</i> (10)	2014	Case series	Humano	13		x						A partir dos 4 meses há formação de osteoide à volta das partículas de AutoBT®, os osteoides substituíram os espaços onde as partículas foram reabsorvidas. AutoBT® reabsorve entre 4 e 6 meses e o processo de remodelação continua até 1 a 2 anos após enxerto.

Regeneração óssea e atuação da BMP-2 na desmineralização da matriz de dentina

Parvini <i>et al</i> (40)	2018	Research	Humano	30	x					x		Após o período de 26 semanas a área de osso formado foi maior nos casos das raízes autólogas o mesmo acontece com a integração do enxerto. Isto deve se ao facto de a MDD não ser tão reabsorvível quanto ao osso.
Kim <i>et al</i> (3)	2015	Clinical cases	Humano		x							Dimensões do alvéolo mantiveram-se. Houve uma redução na largura, mas a altura manteve-se. A razão poderá ser o facto do bloco colocado ter sido na zona exata da raiz extraída, não tendo existido nenhuma sobrecorreção. Em pó ou bloco com membrana de titânio poderá ser melhor para manter as dimensões, porque atua como uma barreira para evitar as forças e <i>stress</i> da gengiva sobre o enxerto.
Kim <i>et al</i> (24)	2014	Clinical cases	Humano	15	x							Aos 2 meses verificaram a presença de células inflamatórias e vascularização, mas com sinais de união das partículas de osso e tecido fibroso. Estava presente osso no local onde houve reabsorção do enxerto. A maioria da formação óssea estava limitada à volta da dentina. Nos 4 meses o enxerto estava completamente fusionado e com osso bem vascularizado.
Jeong <i>et al</i> (41)	2011	Clinical study	Humano	51	x							Confirmaram a presença de osso a partir do 3 ^o mês.
Bakhshalian <i>et al</i> (25)	2013	Study pilot	Coelho	6	x				x			Foi possível ver no MDD aos 15 dias tecido conjuntivo fibroso sem invasão de células inflamatórias, aos 30 dias formação óssea nos bordos, 45 dias extensão para o centro, 60 dias osso imaturo que foi remodelado em osso lamelar e medula óssea visível no tecido ósseo maduro. 75 dias todos os defeitos têm osso novo e medula óssea visível a volta do osso trabeculado, 90 dias encerramento completo do defeito. Em nenhuma altura houve sinais de inflamação. No grupo controlo aos 15 dias tecido fibroso e sem osso, 30 dias pouco osso ondular a volta

Regeneração óssea e atuação da BMP-2 na desmineralização da matriz de dentina

												do defeito e o resto com tecido fibroso e necrótico, 45 e 60 dias o osso a volta do defeito estava mais maduro e o centro preenchido com tecido conjuntivo, 75 dias quantidade de osso aumentou e medula observada nas zonas de osso lamelar, 90 dias aumento formação óssea, no entanto o centro continuou com tecido conjuntivo. Sem sinais de infecção nem inflamação. A percentagem de regeneração óssea foi maior no grupo experimental em qualquer fase do estudo.
Bakhshalian <i>et al</i> (43)	2013	Research	Coelho	30	x				x			A espessura do osso é maior no grupo experimental (MDD) em qualquer altura do estudo, no entanto no fim do estudo as diferenças entre controlo e experimental não eram estatisticamente significativas. O volume ósseo foi significativamente maior no grupo experimental aos 15, 30 e 60 dias, mas aos 90 apesar de maior, não houveram valores significativos. A espessura trabecular era maior no 15º e 60º dias no grupo controlo com diferenças estatisticamente significativas aos 60 dias, no entanto no fim a espessura foi maior no grupo experimental. O número de osso trabecular foi maior no grupo experimental em todas as fases do estudo.

9. Proposta de um estudo

OBJETIVOS

- Estudar a eficácia de vários graus de desmineralização na desinfecção da matriz de dentina utilizada como enxerto ósseo.
- Comprovar se a intensidade de desmineralização da matriz de dentina interfere na libertação e atuação da proteína BMP-2.

MATERIAL E MÉTODOS

A investigação que se pretende desenvolver será efetuada com dentes extraídos de pacientes que se dirijam ao serviço da Clínica da Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto. Os dentes recolhidos para este estudo serão unicamente os dentes com extração indicada.

A seleção dos dentes extraídos será feita através dos seguintes critérios:

- Critério de inclusão: Dentes definitivos humanos vitais extraídos.
- Critério de exclusão: Dentes com tratamento endodôntico radical.

A população alvo será dividida em dois grupos:

- **Grupo A** - estudo microbiológico do particulado;
- **Grupo B** - quantificação da expressão da proteína *Bone Morphogenetic Protein 2* do particulado;

Cada grupo será subdividido em 3 sub-grupos consoante o processo de desinfecção e grau de desmineralização:

Para todos os sub-grupos a seleção da amostra será feita de forma aleatória, sem necessidade de recolha de história clínica do paciente. A seleção dos dentes deverá seguir unicamente os critérios de inclusão e exclusão.

- **Sub-Grupo 1 (controlo) - Não desmineralizado, não desinfetado**

Após a extração, o dente deverá ser limpo com soro, removendo-se o ligamento periodontal com broca laminada ou com uma lâmina de bisturi. O dente deverá ser seccionado pela junção amelocementária. Qualquer tipo de material restaurador deverá ser removido, bem como as manchas presentes cimento e/ou dentina com uma broca diamantada. A polpa também deverá ser removida. Posteriormente a este tratamento o dente será moído.

- **Sub-Grupo 2 – Desmineralização parcial**

Para este sub-grupo a diferença ao sub-grupo 2 é relativamente à desmineralização onde será aplicado o protocolo da Smart Dentin Grinder®.

- **Sub-Grupo 3 – Desmineralização completa**

Para este sub-grupo a diferença ao sub-grupo 3 é relativamente ao tempo de emersão da amostra no produto desmineralizante do protocolo da Smart Dentin Grinder®. O tempo de submersão será extravasado para simular uma desmineralização completa.

Em todos os grupos a moagem é feita através do dispositivo Smart Dentin Grinder® para obter duas medidas de partículas.

Cada subgrupo será testado com uma análise microbiológica e uma quantificação por *Western blotting*.

RESULTADOS ESPERADOS E SUA RELEVÂNCIA

Os resultados do estudo apresentado pretendem contribuir para alargar o conhecimento sobre este novo material de enxerto ósseo. Pretende também verificar se existe algum risco de contaminação, devido a presença de microrganismos após o processamento da matriz de dentina sem prejudicar a libertação e atuação da proteína BMP-2.

RISCOS

Este estudo não acarreta qualquer tipo de risco para os eventuais participantes, exceto os inerentes às exodontias.

CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética da FMDUP (Anexo 1).

Todos os dados recolhidos e os resultados obtidos no decorrer da investigação serão totalmente confidenciais, salvaguardando-se sempre a identidade e anonimato dos seus participantes, ficando limitado o seu acesso aos investigadores responsáveis.

A inclusão dos resultados deste estudo em publicações e/ou conferências compreenderá a salvaguarda da identidade de todos os seus participantes permitindo o seu anonimato.

O consentimento informado (Anexo 2) deverá ser acompanhado por um documento informativo (Anexo 3) e por uma explicação verbal, feito pelo investigador/a, sobre os principais aspetos do estudo, os riscos, a participação e/ou desistência espontânea, a confidencialidade e os contactos dos investigadores. O consentimento informado a aplicar deverá estar de acordo com as recomendações internacionais de ética para a Investigação Médica em Humanos da Declaração de Helsínquia e ser devidamente aprovado pela Comissão de Ética respetiva ao centro/instituição de investigação. Ambos os documentos deverão ser assinados e duplicados, ficando um exemplar com o participante no estudo e o outro com a investigadora principal.

CONCLUSÕES

A evidência científica disponível descreve o potencial da matriz de dentina associada à BMP-2 na osteogênese e como material de enxerto ósseo.

Atualmente, existe consenso entre vários autores relativamente à eficácia da MDD na regeneração óssea, no entanto ainda não se chegou a uma conclusão sobre qual seria o melhor protocolo para a sua obtenção. Na literatura científica encontram-se descritos vários protocolos, mas poucos detalhados, não uniformizados e não reprodutíveis. Entre eles destacaram-se dois, o AutoBT® cujo protocolo é realizado no *Korea Tooth Bank* e pode demorar até vários dias para ser utilizado, e o protocolo do Smart Dentin Grinder® totalmente *in-office*, que permite uma utilização do particulado no mesmo dia da cirurgia.

Desta forma, torna-se pertinente o desenvolvimento de novos estudos para definição de um protocolo exequível ou aferição de algum dos existentes que potencia a ação das proteínas, não colagénicas como de outros fatores de crescimentos, sem correr o risco de colocar um enxerto contaminado que possa prejudicar o sucesso da regeneração óssea.

BIBLIOGRAFIA


1. Binderman I HG, Nardy C, Yaffe A, Sapoznikov L. . A Novel Procedure to Process Extracted Teeth for Immediate Grafting of Autogenous Dentin. *J Interdiscipl Med Dent Sci* 2014;2:154.
2. Kim E-S, Lee I-K, Kang J-Y, Lee E-Y. Various autogenous fresh demineralized tooth forms for alveolar socket preservation in anterior tooth extraction sites: a series of 4 cases. *Maxillofac Plast Reconstr Surg.* 2015;37(1):27-.
3. Kim ES, Lee IK, Kang JY, Lee EY. Various autogenous fresh demineralized tooth forms for alveolar socket preservation in anterior tooth extraction sites: a series of 4 cases. *Maxillofac Plast Reconstr Surg.* 2015;37(1):27.
4. Del Canto-Diaz A, de Elio-Oliveros J, Del Canto-Diaz M, Alobera-Gracia MA, Del Canto-Pingarron M, Martinez-Gonzalez JM. Use of autologous tooth-derived graft material in the post-extraction dental socket. Pilot study. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2019;24(1):e53-e60.
5. Um IW, Kim YK, Park JC, Lee JH. Clinical application of autogenous demineralized dentin matrix loaded with recombinant human bone morphogenetic-2 for socket preservation: A case series. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2019;21(1):4-10.
6. Park S-M, Um I-W, Kim Y-K, Kim K-W. Clinical application of auto-tooth bone graft material. *Korean Assoc Oral Maxillofac Surg.* 2012;38:2.
7. Calvo-Guirado JL, Mate-Sanchez de Val JE, Ramos-Oltra ML, Perez-Albacete Martinez C, Ramirez-Fernandez MP, Maiquez-Gosalvez M, et al. The Use of Tooth Particles as a Biomaterial in Post-Extraction Sockets. Experimental Study in Dogs. *J Dent.* 2018;6(2).
8. Lee du H, Yang KY, Lee JK. Porcine study on the efficacy of autogenous tooth bone in the maxillary sinus. *J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg.* 2013;39(3):120-6.
9. Um IW, Kim YK, Mitsugi M. Demineralized dentin matrix scaffolds for alveolar bone engineering. *J. Indian Prosthodont. Soc.* 2017;17(2):120-7.
10. Kim YK, Yun PY, Um IW, Lee HJ, Yi YJ, Bae JH, et al. Alveolar ridge preservation of an extraction socket using autogenous tooth bone graft material for implant site development: prospective case series. *J Adv Prosthodont.* 2014;6(6):521-7.
11. Jin SY, Kim SG, Oh JS, You JS, Lim SC, Jeong MA, et al. Histomorphometric Analysis of Contaminated Autogenous Tooth Graft Materials After Various Sterilization. *Implant Dent.* 2016;25(1):83-9.
12. Murata M. Autogenous demineralized dentin matrix for maxillary sinus augmentation in human: The first clinical report. *J Dent Res.* 2003;82:B243.
13. Koga T, Minamizato T, Kawai Y, Miura K, I T, Nakatani Y, et al. Bone Regeneration Using Dentin Matrix Depends on the Degree of Demineralization and Particle Size. *PloS one.* 2016;11(1):e0147235.
14. Kim YK, Kim SG, Yun PY, Yeo IS, Jin SC, Oh JS, et al. Autogenous teeth used for bone grafting: a comparison with traditional grafting materials. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2014;117(1):e39-45.
15. Gual-Vaques P, Polis-Yanes C, Estrugo-Devesa A, Ayuso-Montero R, Mari-Roig A, Lopez-Lopez J. Autogenous teeth used for bone grafting: A systematic review. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2018;23(1):e112-e9.
16. Kim ES. Autogenous fresh demineralized tooth graft prepared at chairside for dental implant. *Maxillofac Plast Reconstr Surg.* 2015;37(1):8.
17. Kim YK, Lee J, Um IW, Kim KW, Murata M, Akazawa T, et al. Tooth-derived bone graft material. *J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg.* 2013;39(3):103-11.

18. Nampo T, Watahiki J, Enomoto A, Taguchi T, Ono M, Nakano H, et al. A new method for alveolar bone repair using extracted teeth for the graft material. *J Periodontol.* 2010;81(9):1264-72.
19. Jun SH, Ahn JS, Lee JI, Ahn KJ, Yun PY, Kim YK. A prospective study on the effectiveness of newly developed autogenous tooth bone graft material for sinus bone graft procedure. *J Adv Prosthodont.* 2014;6(6):528-38.
20. Kim KW. Bone Induction by Demineralized Dentin Matrix in Nude Mouse Muscles. *Maxillofac Plast Reconstr Surg.* 2014;36(2):50-6.
21. Kim YK, Kim SG, Um IW, Kim KW. Bone grafts using autogenous tooth blocks: a case series. *Implant Dent.* 2013;22(6):584-9.
22. Nam J-W, Kim M-Y, Han S-J. Cranial bone regeneration according to different particle sizes and densities of demineralized dentin matrix in the rabbit model. *Maxillofac Plast Reconstr Surg.* 2016;38.
23. Kim SY, Kim YK, Park YH, Park JC, Ku JK, Um IW, et al. Evaluation of the Healing Potential of Demineralized Dentin Matrix Fixed with Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2 in Bone Grafts. *Materials (Basel, Switzerland).* 2017;10(9).
24. Kim YK, Kim SG, Bae JH, Um IW, Oh JS, Jeong KI. Guided bone regeneration using autogenous tooth bone graft in implant therapy: case series. *Implant Dent.* 2014;23(2):138-43.
25. Bakhshalian N, Jalayer T, Shahoos H, Arjmandi BH, Azimi HR. Osteopromotive property of allogenic demineralized dentin matrix: a pilot study. *J West Soc Periodontol Periodontal Abstr.* 2013;61(2):35-8.
28. Bessho K, Tagawa T, Murata M. Purification of rabbit bone morphogenetic protein derived from bone, dentin, and wound tissue after tooth extraction. *J Oral Maxillofac Surg.* 1990;48(2):162-9.
29. Bono N, Tarsini P, Candiani G. BMP-2 and type I collagen preservation in human deciduous teeth after demineralization. *J Appl Biomater Funct Mater.* 2019;17(2):2280800018784230.
30. Wlodarski P, Galus R, Brodzikowska A, Wlodarski K. Osteogenic Efficiency of Demineralized and Lyophilized Xenogeneic Bone and Syngeneic Dentine Implants in Mice. *Folia Biol.* 2013;61:25-9.
31. Um IW, Hwang SH, Kim YK, Kim MY, Jun SH, Ryu JJ, et al. Demineralized dentin matrix combined with recombinant human bone morphogenetic protein-2 in rabbit calvarial defects. *Korean Assoc Oral Maxillofac Surg.* 2016;42(2):90-8.
32. Um IW, Ku JK, Lee BK, Yun PY, Lee JK, Nam JH. Postulated release profile of recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) from demineralized dentin matrix. *Korean Assoc Oral Maxillofac Surg.* 2019;45(3):123-8.
33. Fiorellini JP, Howell TH, Cochran D, Malmquist J, Lilly LC, Spagnoli D, et al. Randomized study evaluating recombinant human bone morphogenetic protein-2 for extraction socket augmentation. *J Periodontol.* 2005;76(4):605-13.
34. Lee KH, Kim YK, Cho WJ, Um IW, Murata M, Mitsugi M. Autogenous tooth bone graft block for sinus augmentation with simultaneous implant installation: a technical note. *Korean Assoc Oral Maxillofac Surg.* 2015;41(5):284-9.
35. Kim Y-K, Lee J, Yun J-Y, Yun P-Y, Um I-W. Comparison of autogenous tooth bone graft and synthetic bone graft materials used for bone resorption around implants after crestal approach sinus lifting: A retrospective study. *J Periodontal Implant Sci.* 2014;44:216-21.
36. Calvo-Guirado JL, Ballester-Montilla A, P NDA, Fernandez-Dominguez M, Alexandre Gehrke S, Cegarra-Del Pino P, et al. Particulated, Extracted Human Teeth Characterization by SEM(-)EDX Evaluation as a Biomaterial for Socket Preservation: An in vitro Study. *Materials (Basel, Switzerland).* 2019;12(3).
37. Kim YK, Pang KM, Yun PY, Leem DH, Um IW. Long-term follow-up of autogenous tooth bone graft blocks with dental implants. *Clin Case Rep.* 2017;5(2):108-18.
38. Kim YK, Kim SG, Lim SC. Familial tooth bone graft for ridge and sinus augmentation: a report of two cases. *Korean Assoc Oral Maxillofac Surg.* 2014;40(1):37-42.

39. de Oliveira GS, Miziara MN, Silva ER, Ferreira EL, Biulchi AP, Alves JB. Enhanced bone formation during healing process of tooth sockets filled with demineralized human dentine matrix. *Aust Dent J*. 2013;58(3):326-32.
40. Parvini P, Sader R, Sahin D, Becker J, Schwarz F. Radiographic outcomes following lateral alveolar ridge augmentation using autogenous tooth roots. *Int J Implant Dent*. 2018;4(1):31.
41. Jeong KI, Kim SG, Kim YK, Oh JS, Jeong MA, Park JJ. Clinical study of graft materials using autogenous teeth in maxillary sinus augmentation. *Implant Dent*. 2011;20(6):471-5.
42. Kabir MA, Murata M, Akazawa T, Kusano K, Yamada K, Ito M. Evaluation of perforated demineralized dentin scaffold on bone regeneration in critical-size sheep iliac defects. *Clin Oral Implants Res*. 2017;28(11):e227-e35.
43. Bakhshalian N, Hooshmand S, Campbell S, Kim J-S, Brummel-Smith K, Arjmandi B. Biocompatibility and Microstructural Analysis of Osteopromotive Property of Allogenic Demineralized Dentin Matrix. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2013;28:1655-62.
44. Voggenreiter G, Ascherl R, Blümel G, Schmit-Neuerburg KP. Effects of preservation and sterilization on cortical bone grafts. *Arch Orthop Trauma Surg*. 1994;113(5):294-6.
45. Woodard JR, Hilldore AJ, Lan SK, Park CJ, Morgan AW, Eurell JA, et al. The mechanical properties and osteoconductivity of hydroxyapatite bone scaffolds with multi-scale porosity. *Biomaterials*. 2007;28(1):45-54.
46. Köhler P, Kricbergs A. Incorporation of autoclaved autogeneic bone supplemented with allogeneic demineralized bone matrix. An experimental study in the rabbit. *Clin Orthop Relat Res*. 1987(218):247-58.
47. Kaye S, Phillips CR. The sterilizing action of gaseous ethylene oxide; the effect of moisture. *Am J Hyg*. 1949;50(3):296-306.
48. Munting E, Wilmart JF, Wijne A, Hennebert P, Delloye C. Effect of sterilization on osteoinduction. Comparison of five methods in demineralized rat bone. *Acta Orthop Scand*. 1988;59(1):34-8.
49. Pekkarinen T, Hietalal O, Jämsä T, Jalovaara P. Gamma irradiation and ethylene oxide in the sterilization of native reindeer bone morphogenetic protein extract. *Scan J Surg*. 2005;94(1):67-70.
50. Shapoff CA, Bowers GM, Levy B, Mellonig JT, Yukna RA. The Effect of Particle Size on the Osteogenic Activity of Composite Grafts of Allogeneic Freeze-Dried Bone and Autogenous Marrow. *J Periodontol*. 1980;51(11):625-30.
51. Bhaskar SN, Cutright DE, Knapp MJ, Beasley JD, Perez B, Driskell TD. Tissue reaction to intrabony ceramic implants. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1971;31(2):282-9.
52. Donovan CMG, Dickerson LNC, Hellstein MJW, Hanson MLJ. Autologous calvarial and iliac onlay bone grafts in miniature swine. *J Oral Maxillofac Surg*. 1993;51(8):898-903.
53. Donos N, Kostopoulos L, Tonetti M, Karring T. Long-term stability of autogenous bone grafts following combined application with guided bone regeneration. *Clin Oral Implants Res*. 2005;16(2):133-9.

ANEXOS

Anexo 1 – Parecer da Comissão de Ética



Exm^a Senhora
Dr^a Estelle Alexandra Alves da Fonte
Faculdade de Medicina Dentária da U. Porto

000032 02 MAR 2020


Assunto: Parecer relativamente ao Projeto de Investigação n^o 23/2019.
(Regeneração óssea e atuação da BMP-2 na desmineralização da matriz de dentina).

Informo V. Exa. que o projeto supracitado foi analisado na reunião da Comissão de Ética para a Saúde, da FMDUP, no dia 17 de janeiro de 2020.
A Comissão de Ética é favorável à realização do projeto tal como apresentado.
O formulário definitivo de apresentação do trabalho, aprovado e carimbado pela Comissão de Ética para a Saúde, da FMDUP, acompanha a presente comunicação.
A Comissão de Ética recomenda a existência de um seguro de responsabilidade civil e relembra que a inexistência de seguro responsabiliza diretamente os investigadores.

Subject: Recommendation on the research project n^o 23/2019.
(Regeneração óssea e atuação da BMP-2 na desmineralização da matriz de dentina).

I hereby inform that the aforementioned project was analyzed on the 17th day of January, 2020, by the Ethics Committee for Health of the Faculty of Dental Medicine.
The Ethics Committee is favourable to the project execution.
The final submission form approved and stamped by FMDUP's Ethics Committee for Health is attached.
The Ethics Committee recommends the existence of liability insurance and recalls that the absence of insurance directly holds researchers accountable.

Com os melhores cumprimentos,
A Presidente da Comissão de Ética para a Saúde, da FMDUP


Prof. Doutora Inês Alexandra Costa Morais Caldas

Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto - FMDUP
Rua Dr. Ricardo Jorge, 164 - 4200-072 Porto - Portugal
Tel: +351 22 000 01 00 Fax: +351 22 000 11 01
www.fmd.up.pt

Anexo 2 – Consentimento informado

Declaração de Consentimento

Considerando a lei nº67/98, de 26 de outubro, alterada pela lei nº103/2015, de 24 de agosto, e a "Declaração de Helsínquia" da Associação Médica Mundial (Helsínquia 1964; Tóquio 1975; Veneza 1983; Hong Kong 1989; Somerset West 1996; Edimburgo 2000, Washington 2002, Tóquio 2004, Seul 2008 e Fortaleza 2013).

(nome completo),
compreendi a explicação que me foi fornecida, por escrito e verbalmente, relativa à investigação que se tenciona realizar na Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto, no para a qual é pedida a minha participação. Foi-me dada oportunidade de fazer as perguntas que julguei necessárias, e para todas obtive resposta satisfatória.

Tomei conhecimento de que, de acordo com as recomendações da Declaração de Helsínquia e do Protocolo Adicional à Convenção dos Direitos do Homem e Biomedicina, relativo à Investigação Biomédica (Protocolo de Estrasburgo de 2005), a informação que me foi prestada versou os objetivos, os métodos, os benefícios previstos, os riscos potenciais e o eventual desconforto. Além disso, foi-me afirmado que tenho o direito de decidir livremente aceitar ou recusar a todo o tempo a minha participação no estudo. Sei que se recusar não haverá qualquer prejuízo na assistência que me é prestada, não terei que suportar qualquer penalização nem quaisquer despesas pela participação neste estudo.

Foi-me dado todo o tempo de que necessitei para refletir sobre esta proposta de participação.

Nestas circunstâncias, decido livremente aceitar participar neste estudo, tal como me foi apresentado pela investigadora **Estelle Alexandra Alves da Fonte** sabendo que a confidencialidade das pacientes e dos dados a elas referentes se encontra assegurada.

Consinto que seja utilizado, para esse fim, os dados (órgão humano - dentes) para publicação científica (formato em papel/digital/conferência/palestra), distribuição e circulação (nacional e/ou internacional) desde que irreversivelmente anonimizados.

Data: ___ / _____ / ___

Assinatura da paciente: _____

Se não for a própria participante a assinar, por incapacidade mental comprovada ou idade inferior a 18 anos:

Nome: _____

BI n.º/CC: _____ datado de ___/___/_____, validade ___/___/_____

Grau de parentesco ou tipo de representação: _____

Assinatura: _____

Anexo 3 – Informação ao paciente

Informação aos pacientes

“REGENERAÇÃO ÓSSEA E ATUAÇÃO DA BMP-2 NA DESMINERALIZAÇÃO DA MATRIZ DE DENTINA”

Introdução

Os dentes autogénicos são um material de enxerto muito útil na prática clínica devido as suas capacidades de formação óssea, mas também devido a sua resposta biológica diminuída devido a homogeneidade genética. Esta investigação tem por objetivo verificar se o grau de desmineralização aplicado aos dentes extraídos permite uma desinfeção adequada do enxerto sem interferir na quantidade de proteína morfogenética de osso (BMP) presente na dentina essencial para a formação óssea.

Procedimento

Os seus dentes extraídos que fazem parte do seu plano de tratamento constituirão o objeto de estudo.

Riscos

Este estudo não acarreta qualquer tipo de risco para os eventuais participantes.

Aspetos Éticos

Este projeto de investigação foi devidamente submetido e aprovado pela Comissão de Ética da Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto.

O grupo de investigadores responsabilizar-se-á pelo respeito pela confidencialidade, mantendo os dados das participantes em total anonimato.

Resultados

Se manifestar interesse, os dados recolhidos serão fornecidos ao paciente.

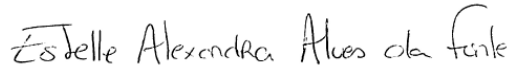
Participação e/ou Desistência

A sua participação é completamente livre, e por isso, se decidir não participar, esta sua decisão não afetará, em qualquer circunstância, a qualidade dos cuidados médicos que lhe são prestados.

Confidencialidade

Todos os registos efetuados neste estudo serão totalmente confidenciais mantendo o respeito máximo pela sua privacidade.

Os seus dados e o seu nome serão substituídos por codificação. Todas as publicações referentes a esta investigação respeitarão a sua privacidade ficando salvaguardado o seu anonimato.


Investigador Principal
Estelle Fonte


Orientador
Prof. Doutor João Carlos Antunes Sampaio Fernandes


Coorientadora
Prof. Doutora Inês Sansonetty Gonçalves Corte-Real

Declaro que recebi, li e compreendi o documento "Informação aos pacientes".

Data: __/__/__

Assinatura do paciente: _____

Investigador Principal: Estelle Fonte

Contacto: 911172827

Correio eletrónico: mimdl2071@fmd.up.pt/ estelle.fonte@gmail.com