



INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

**PLANEAMENTO DE UM ESTUDO SOBRE AS
CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS E BIOLÓGICAS DO
ESMALTE, ONDE FORAM INDUZIDAS LESÕES ARTIFICIAS DE
CARIE DENTÁRIA**

Trabalho submetido por
ANDRÉ FILIPE NEVES FARIA
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

outubro de 2019



INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

**PLANEAMENTO DE UM ESTUDO SOBRE AS
CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS E BIOLÓGICAS DO
ESMALTE, ONDE FORAM INDUZIDAS LESÕES ARTIFICIAS DE
CARIE DENTÁRIA**

Trabalho submetido por
ANDRÉ FILIPE NEVES FÁRIA
para a obtenção do grau de **Mestre** em Medicina Dentária

Trabalho orientado por
PROF. DOUTORA ANA CRISTINA MANSO

e coorientado por
PROF. DOUTORA CARLA ASCENSO
PROF. DOUTORA MARIA ALZIRA CAVACAS

outubro de 2019

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar quero agradecer à minha orientadora, Prof. Doutora Ana Cristina Manso, pela orientação deste projeto bem como o constante apoio, motivação e rigor impostos, tornando-me, sem dúvida, na minha melhor versão. Obrigado igualmente pela grande amizade, motivação, respeito e por ter confiado em mim. Ser-lhe-ei eternamente grato.

Às minhas coorientadoras, Prof. Doutora Carla Ascenso e Prof. Doutora Maria Alzira Cavacas pela ajuda preciosa, empatia e pela prontidão em esclarecer qualquer dúvida, a qualquer hora do dia.

Às técnicas de laboratório Susana, Natacha e Sandra pelo apoio prestado. Sem vocês não seria possível este projeto. Um agradecimento especial também ao Técnico Gonçalo pelo empenho, por acreditar neste projeto, pela dedicação mesmo quando a vida pessoal podia o não permitir. Um muito obrigado a todos.

À Cooperativa de Ensino Superior Egas Moniz e ao Instituto Universitário Egas Moniz por ser a minha segunda casa e com certeza por me ter proporcionado o melhor tempo de faculdade. Levo comigo as melhores memórias, possíveis unicamente por esta casa.

Aos meus colegas e, principalmente, aos amigos que levo desta faculdade. Em especial à Marta C., à Patrícia, à Rita e à Marta G. que me acompanhem desde o primeiro dia de faculdade, que me viram crescer e cresceram a meu lado, tanto a nível pessoal como profissional. Sem vocês não teria sido o mesmo!

Aos meus afilhados que esta faculdade me deu, Joana, Joana, Gonçalo e Jéssica. Espero que aquilo que me vos transmiti seja o mesmo que em tempos fizeram por mim. Levo com vocês uma amizade imensa e sem vocês não seria o mesmo.

À AEISCEM, por ser a minha escola da vida. Pelas conquistas e derrotas. Hoje não sou a mesma pessoa se não tivesse passado por tudo isto.

À TinTuna por ter sido muito mais que aquilo que poderia imaginar. Foi das decisões mais difíceis que tomei. Pelas lembranças, pela companheirismo e amizades aqui criadas. Éramos tristes rapazes, sem rumo e sem destino, mas encontramos a TinTuna para trilhar o nosso caminho. Agradeço muito por tudo. Fizeram-me sentir, novamente, em casa.

A ti, que tens sido a melhor pessoa que poderia ter encontrado. Derrubámos muitas barreiras e conquistámos muito, mas muito mais virá. Espero estar contigo, ao teu lado durante muito tempo. Será sempre um desafio, mas com o teu sorriso, amizade e companheirismo será sempre muito mais fácil.

Por fim, à minha família que é a melhor do mundo. Obrigada a todos por acreditarem em mim, pelo apoio e carinho constante. Sem vocês isto não seria possível.

RESUMO

A cárie dentária é uma doença multifatorial que afeta grande parte da população mundial, sendo uma das doenças orais mais prevalentes. Consiste na perda de estrutura dentária provocada por um aumento gradual da desmineralização da matriz inorgânica. Este evento é promovido quando existe um aumento dos fatores patológicos em detrimento dos fatores protetores.

A desmineralização inicialmente ocorre na superfície do cristal de hidroxiapatite, criando lesões incipientes não cavitadas no esmalte, denominadas de *white spot lesions* (WSL), e pode continuar este processo de desmineralização, pode ocorrer a cavitação, atingindo a dentina e posteriormente a polpa.

Quando o equilíbrio desmineralização-rem mineralização é afetado, existindo os primeiros sinais de desmineralização da matriz inorgânica, é necessário interromper este processo. A remineralização ocorre naturalmente, através da deposição de íons de cálcio e fosfato, presentes na saliva. No entanto, em muitos casos, a existência destes fatores protetores não são suficientes para interromper a desmineralização, sendo necessário a aplicação tópica de agentes remineralizadores.

A Caseína Fosfopeptídica – Fosfato de Caseína Amorfo (CPP-ACP) tem sido descrito como um agente remineralizador eficaz, já que a sua aplicação tópica, permite a deposição de íons cálcio e fosfato, na superfície do esmalte, remineralizando os cristais de hidroxiapatite.

Após a remineralização de lesões não cavitadas, quando esta já não detém potencial remineralizador, pode-se recorrer ao uso de resinas infiltrantes já que esta tem uma grande capacidade de infiltrar por capilaridade, na matriz inorgânica, sendo uma excelente ferramenta para ocluir as microporosidades provocadas pela desmineralização.

Palavras-Chave: cárie dentária, desmineralização, remineralização, white spots, CPP-ACP, resina infiltrante

ABSTRACT

Dental caries is a multifactorial disease that affects a large part of the world population, being one of the most prevalent oral diseases. It consists in the loss of dental structure caused by a gradual increase of demineralization of the inorganic matrix. This event is promoted when there is an increase in pathological factors over protective factors.

Demineralization initially occurs on the surface of the hydroxyapatite crystal, creating incipient non-cavitated enamel lesions, called white spot lesions (WSL) and can continue this demineralization process, cavitation may occur, reaching the dentin and later the pulp.

When the demineralization-remineralization equilibrium is affected, with the first signs of demineralization of the inorganic matrix, it is necessary to interrupt this process. Remineralization occurs naturally through the deposition of calcium and phosphate ions present in saliva. However, in many cases, the existence of these protective factors is not sufficient to stop demineralization, requiring topical application of remineralizing agents.

The Phosphopeptide Casein - Amorphous Casein Phosphate (CPP-ACP) has been described as an effective remineralizing agent, as its topical application allows the deposition of calcium and phosphate ions on the enamel surface, remineralizing hydroxyapatite crystals.

After remineralization of non-cavitated lesions, when it no longer possesses remineralizing potential, the use of infiltrating resins can be resorted to as it has a great ability to infiltrate by capillarity into the inorganic matrix, being an excellent tool to occlude.

Keywords: dental caries, demineralization, remineralization, white spots, CPP-ACP, infiltrating resin

ÍNDICE GERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	7
ÍNDICE DE TABELAS	9
LISTA DE ABREVIATURAS.....	11
I. INTRODUÇÃO.....	13
1. Esmalte Humano.....	14
1.1. Estrutura.....	14
1.2. Propriedades Químicas	18
2. Saliva	20
2.1. Composição da Saliva	20
2.2. Propriedades da Saliva.....	21
2.3. Saliva Artificial.....	26
3. Cárie Dentária.....	27
3.1. Aspectos Bioquímicos	28
3.2. Aspectos Histológicos	30
3.3. Manifestações Clínicas	31
3.4. Diagnóstico e Índices de Classificação	32
3.5. Epidemiologia.....	35
3.6. Prevenção.....	36
3.7. Tratamento de Lesões de Esmalte não Cavitadas.....	37
3.7.1. Remineralização das lesões de cárie.....	37
3.7.1.1. Flúor.....	39
3.7.1.2. Caseína Fosfopeptídica – Fosfato de Cálcio Amorfo (CPP-ACP).....	40
3.7.2. Resina Infiltrante ICON®	41
II. DESENVOLVIMENTO.....	45
1. Objetivo do Estudo	45
2. Construção do Projeto	45
3. Considerações Ética.....	46
4. Amostragem.....	46
5. Aleatorização das Amostras	47
6. Corte das Amostras.....	47
7. Seleção de Materiais e Técnicas.....	48
7.1. Simulação das Lesões de Cárie Artificiais (<i>White Spots</i>).....	48
7.2. Saliva Artificial.....	49

7.3.	Aplicação de CPP-ACP e ICON®	49
8.	Análise Histológica das Amostras ao Microscópio Ótico	50
8.1.	Fixação.....	51
8.2.	Desidratação	51
8.3.	Infiltração.....	52
8.4.	Polimerização	52
8.5.	Corte das Amostras.....	52
8.6.	Observação Microscopia Ótica.....	53
9.	Protocolo Experimental	53
10.	Fluxograma do Trabalho Experimental.....	55
III.	CONCLUSÃO.....	57
IV.	BIBLIOGRAFIA	59

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Constituição do Esmalte	14
Figura 2 - Bandas Hunter-Schreger em esmalte humano. A: Corte longitudinal da face palatina e oclusal de um pré-molar maxilar. B: Comparação do padrão das Bandas Hunter-Schreger num primeiro molar maxilar. São mais abundantes nas zonas oclusais do que nas cervicais (Adaptado de Lynch et al., 2011).....	16
Figura 3 - Microestrutura do esmalte. Neste esquema identifica-se os cristais de hidroxiapatite presentes nos prismas do esmalte. Destaque das estruturas (Adaptado de Garrido, Giráldez, Ceballos, Río, & Rodríguez, 2011).....	17
Figura 4 - Esquema representativo de Cristal de Hidroxiapatite.....	17
Figura 5 - Diagrama ilustrativo da estrutura da hidroxiapatite (Adaptado de Mazumder et al., 2016).....	19
Figura 6 - Ilustração da localização das Glândulas Salivares (Adaptado de Maruyama, Monroe, Hunt, Buchmann, & Baker, 2019).	21
Figura 7 - Funções da Saliva (Adaptado de Carpenter, 2013)	26
Figura 8 - Ilustração dos fatores que contribuem para o desenvolvimento da doença de cárie (Adaptado de Selwitz et al., 2007).....	28
Figura 9 - Conceito de equilíbrio da cárie, mostrando o equilíbrio entre fatores patogénicos e fatores protetores (Adaptado de Pitts et al., 2017).....	30
Figura 10 - Diferentes classificações para estadios da doença de cárie (Adaptado de Nigel B Pitts et al., 2017)	32
Figura 11 - Esquema representativo dos cortes a efetuar em cada dente e de um exemplo de esquema de cores	48
Figura 12 - Espécime resultante dos cortes efetuados.....	48
Figura 13 - Fluxograma do Trabalho Experimental.....	55

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Funções dos vários componentes da saliva (Adaptado de García-Godoy & Hicks, 2008).....	25
Tabela 2 - Critérios associados ao estado da superfície dentária baseados no ICDAS II	34
Tabela 3 - Critérios associados à presença ou não de cárie e ao seu estado, baseados no ICDAS II.....	34

LISTA DE ABREVIATURAS

% – Percentagem

CPP-ACP - Caseína Fosfopeptídica – Fosfato de Caseína Amorfo

FA – Fluoroapatite

Fig. – Figura

FOTI – Transiluminação com Fibra Ótica

HA - Hidroxiapatite

ICDAS II - International Caries Detection and Assessment System II

IR - Índice Refratário

ISO – Internacional Organization Standardization

JAC - Junção amelocimentária

nm – Nanómetro

pH – Potencial Hidrogénico

Rpm – Rotações por minuto

TEGDMA – Trietilenglicol de dimetacrilato

WSL - White Spots Lesions

μ – Mililitro

mm – Milímetro

mM –Milimolar

μm – Micrómetro

I. INTRODUÇÃO

A cárie dentária é uma das doenças crônicas mais prevalentes na população mundial e humana. Esta doença constituiu a principal causa de perda dentária, quer em adultos, quer em crianças e manifesta-se comumente através de carie coronária, podendo ainda apresentar-se sob a forma de carie radicular na população mais idosa. As lesões de carie podem evidenciar-se desde formas mais incipientes, até formas mais severas, levando à perda completa da peça dentária (Indrapriyadharshini, Madan Kumar, Sharma, & Iyer, 2018), sendo vários os fatores etiológicos que se envolvem neste processo cariioso (J. Featherstone, 2008; García-Godoy & Hicks, 2008; Nigel B Pitts et al., 2017).

A saliva tem um papel importante na remineralização das lesões incipientes de cárie, já que pode disponibilizar íões flúor, cálcio e fosfato ao dente (Buzalaf, Hannas, & Kato, 2012; Marsh, Do, Beighton, & Devine, 2016; X. Wang, Mihailova, Klocke, Heidrich, & Bismayer, 2011). A remineralização consiste numa saturação destes íões, já que, desta forma, existe uma deposição dos íões nas superfícies desmineralizadas.

No entanto, quando as condições orais favorecem a desmineralização, e por consequente o aparecimento de lesões incipientes de cárie, existem técnicas e procedimentos, mais e menos invasivos, capazes de impedir o progresso da doença por cárie (Niu et al., 2014).

O flúor tem um papel importante na remineralização, sendo os produtos fluoretados de aplicação tópica eficaz na remineralização do esmalte, inibindo a desmineralização (Fernández-Barrera et al., 2019; Niu et al., 2014; Selwitz, Ismail, & Pitts, 2007; Warreth, Abuhijleh, Almaghribi, Mahwal, & Ashawish, 2019). No entanto, a biodisponibilidade do flúor está dependente da concentração dos íões cálcio e fosfato presentes na saliva, sendo necessário o desenvolvimento de novos produtos e técnicas que favoreçam a remineralização (Kannan & Padmanabhan, 2019; Niu et al., 2014; Philip, 2019; Ranjbar O, 2018; Wierichs et al., 2017).

Este planeamento visa reprodução do tratamento de lesões desmineralizadas em esmalte e a sua análise histológica, tendo como pressuposto a correspondência da lesão observada clinicamente com a sua tradução histológica.

1. Esmalte Humano

1.1. Estrutura

Os tecidos mineralizados do corpo humano são caracterizados pela presença de depósitos de mineral, que lhes conferem a rigidez e a dureza que lhes são características. Genericamente, o esmalte humano, é constituído por matéria inorgânica (96%) que se integra a uma matriz composta por água (3%) e matéria orgânica (1%) (Figura 1) disposta numa estrutura prismática, funcionando para manter a matriz inorgânica junta (Nigel B Pitts et al., 2017).

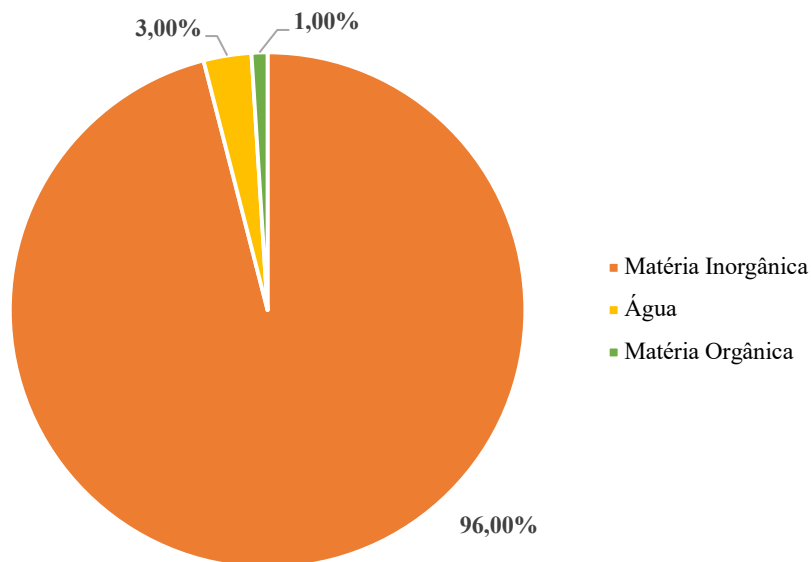


Figura 1 - Constituição do Esmalte

O esmalte dentário é um tecido maioritariamente mineralizado, que cobre a coroa anatómica, sendo o tecido mais duro do corpo humano. Tem uma estrutura acelular e avascular, sem capacidade de regeneração ou de autorreparação. Este fenómeno acontece devido ao mecanismo de formação do esmalte (amelogénese) (Ben-nissan, 2014). Este tecido tem origem epitelial, ao contrário de outros tecidos mineralizados, que têm origem conjuntiva, e por esta razão a constituição dos seus componentes orgânicos e os mecanismos de mineralização são diferentes, possuindo características importantes. A amelogénese inicia-se pela segregação da matriz orgânica, pelos ameloblastos, para o espaço extracelular, adjacente à junção amelocimentária. Esta matriz, rica em proteínas, controla a biomineralização do esmalte, iniciando, regulando e ordenando a precipitação

dos cristais de hidroxiapatite. A matriz do esmalte é composta por proteínas, amelogeninas hidrofóbicas e não-amelogeninas como, ameloblastinas, enamelinas e tuftelinas. Aquando da deposição mineral, as proteínases do esmalte, seletivamente, degradam e removem a matriz orgânica, dando origem a uma mineralização desta matriz. Depois na fase de maturação, os ameloblastos desaparecem não havendo mais deposição de esmalte (Thompson, 2019).

O esmalte é um tecido constituído maioritariamente por uma forma não estequiométrica de hidroxiapatite, carbonatada e deficiente em cálcio diferente da hidroxiapatite mineral $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{OH}_2$ (A. Lussi, Schlueter, Rakhmatullina, & Ganss, 2011). Esta matéria inorgânica é formada por compostos como cálcio e fosfato, podendo ainda apresentar na sua constituição outros minerais como potássio, magnésio, sódio e zinco. Apesar desta constituição, o esmalte é extramente friável, apesar de duro, e por esse motivo, a dentina que se encontra subjacente, tem o papel de sustentar e reduzir a possibilidade de fratura, durante a mastigação, por exemplo (West & Joiner, 2014).

Estruturalmente, no esmalte, pode considerar-se níveis hierárquicos de organização, explicando alguns aspetos biomecânicos deste tecido, como a resistência. Podemos encontrar uns feixes combinados designados de Bandas de Hunter-Schreger (Figura 2). Estas bandas têm aproximadamente 50 μm de largura e são visíveis devido às diferentes direções que os prismas de esmalte apresentam e pela maneira que refletem e transmitem a luz. Depois, num segundo nível, é constituído por unidades estruturais, chamadas de prismas. Ainda existem zonas periféricas a estas, denominadas de regiões interprismáticas, completando assim a estrutura cristalina (Lynch et al., 2011).

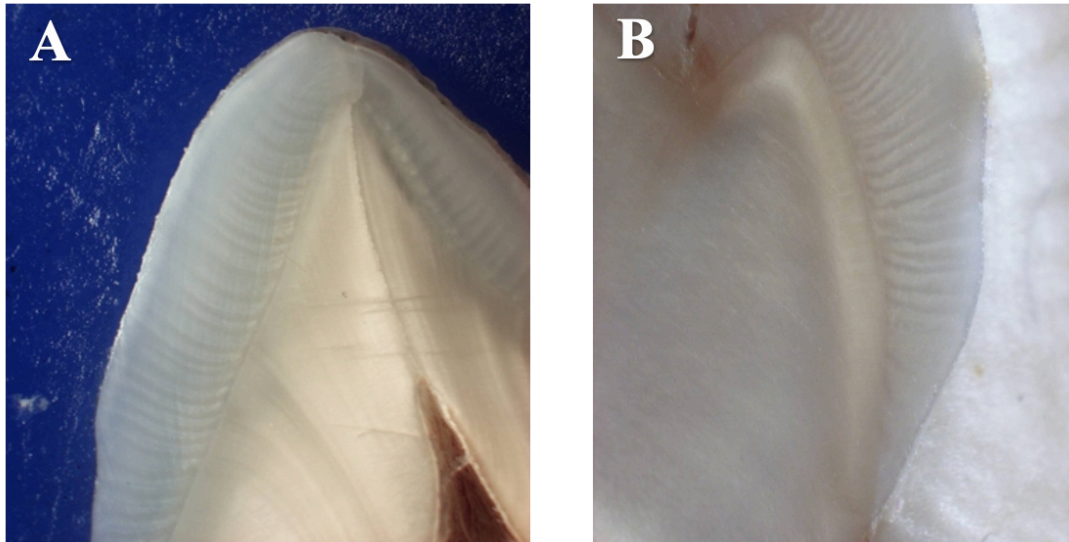


Figura 2 - Bandas Hunter-Schreger em esmalte humano. A: Corte longitudinal da face palatina e oclusal de um pré-molar maxilar. B: Comparação do padrão das Bandas Hunter-Schreger num primeiro molar maxilar. São mais abundantes nas zonas oclusais do que nas cervicais (Adaptado de Lynch et al., 2011)

Os prismas são barras mais ou menos cilíndricas, com 5-8 μm de diâmetro, perpendiculares à junção amelocimentária (JAC), que se estendem desde o esmalte aprismático, que é a camada depositada no início da amelogénese, até a superfície externa do esmalte. Nalgumas zonas, a zona externa do esmalte pode estar coberta por esmalte aprismático. Os cristais de hidroxiapatite, altamente empacotados, 1-2nm entre si, dispõem-se seguindo, por norma, o longo eixo dos prismas. Cerca de 10000-40000 destes cristais, com uma densidade de 550 cristais/ μm , formam um prisma. Do centro dos prismas até à sua periferia, a orientação dos cristais vai-se mudando, havendo uma inclinação progressiva até ao limite do prisma (Arrieta, Z. L., Fogalli, G. B., & Line, 2018).

Num corte transversal, os prismas de esmalte podem ter vários padrões, sendo o mais o comum o de “buraco de fechadura”, podendo ser descritas duas partes: uma cabeça e uma cauda (Figura 3). A cabeça é arredondada e circunscrita por uma bainha proteica de 0,5 μm de espessura. Por sua vez, a cauda é uma estrutura menos definida e que acaba por se fundir com as zonas interprismáticas (Garrido, Giráldez, Ceballos, Río, & Rodríguez, 2011).

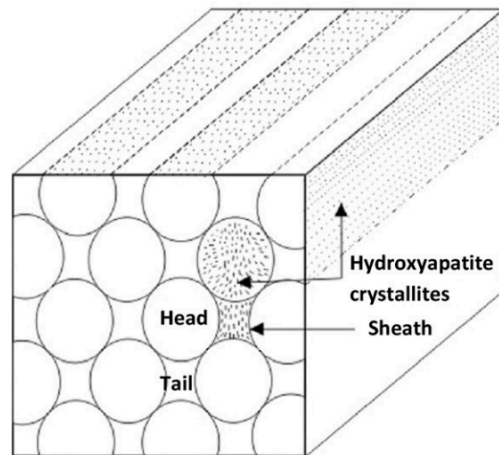


Figura 3 - Microestrutura do esmalte. Neste esquema identifica-se os cristais de hidroxiapatite presentes nos prismas do esmalte. Destaque das estruturas (Adaptado de Garrido et al., 2011)

Junto à JAC, embora sejam considerados retilíneos, os cristais apresentam uma leve ondulação, tendendo a serem mais retilíneos ao longo do percurso, até a superfície externa.

Os cristais de hidroxiapatite, constituintes da fase mineral do esmalte, apresentam um aspeto de barra hexagonal, com, aproximadamente, uma largura de 70nm e uma espessura de 30nm, estando organizados em estruturas prismáticas e interprismáticas. Estes cristais têm 5nm de diâmetro, aproximadamente, paralelos entre si (Figura 4) (Arrieta, Z. L., Fogalli, G. B., & Line, 2018).

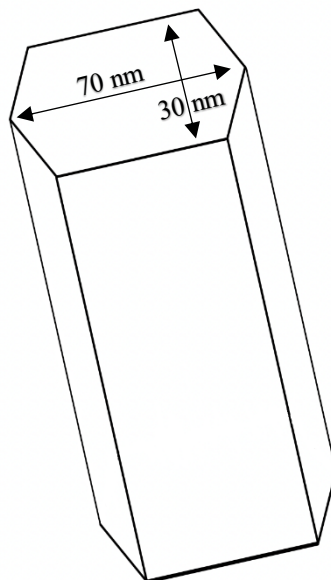


Figura 4 - Esquema representativo de Cristal de Hidroxiapatite

Como referido anteriormente, aquando da erupção completa do dente a maior parte da matriz orgânica é removida durante a maturação do esmalte, pela atividade das proteínases. Embora isto aconteça, algumas proteínas que ficam retidas nos cristais de

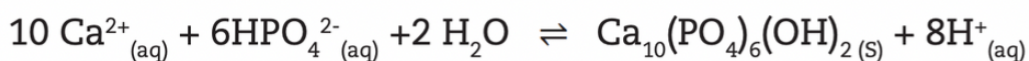
hidroxiapatite são resistentes à ação das proteínases, pela sua íntima ligação com os cristais de hidroxiapatite. Esta matriz residual é um complexo proteico formado por diferentes péptidos, os quais mantêm os cristais juntos uns aos outros. Tem sido demonstrado que a presença deste complexo peptídico, influencia as propriedades óticas e mecânicas do esmalte, sendo de bastante importância esta função (Mazumder, Prajapati, Bapat, & Moradian-Oldak, 2016).

O esmalte, que se encontra na parte externa da coroa, apresenta várias características diferentes, de acordo com a localização na coroa. É mais espessa nas zonas oclusais e incisais, e tendencialmente mais fina, caminhando para junto da JAC (Stephen Molnar & Gantt, 1977).

1.2. Propriedades Químicas

A hidroxiapatite (HA) é o tipo de apatite biológica que se encontra presente nos tecidos mineralizados, mais abundante no esmalte. Os cristais de hidroxiapatite por norma não se encontram numa estrutura perfeita, apresentando várias conformações. A sua fórmula básica, e comumente descrita na literatura como, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{OH}_2$. A relação cálcio/fosfato (Ca/P) é variada, mas geralmente encontra-se na proporção 1,61 e não na encontrada na hidroxiapatite mineral, que geralmente é de 1,66 (Adrian Lussi & Carvalho, 2015).

Segundo Lacruz, et al. (2017), os iões cálcio (Ca^{2+}) e fosfato (PO_4^{3-}) são pouco solúveis em água, e normalmente, formam um precipitado cristalino ou amorfo. Em condições fisiológicas, a apatite é, entre os minerais cálcio-fosfato, a que apresenta menor solubilidade, sendo o mineral quimicamente mais estável. A precipitação para a formação dos cristais de hidroxiapatite pode ocorrer de acordo com a fórmula:



A libertação dos 8 prótons acidifica o meio, sendo necessária uma regularização do pH, que na amelogénese é assegurada pelos ameloblastos.

Embora apresente um arranjo cristalino altamente organizado, a hidroxiapatite mantém-se em equilíbrio com o meio envolvente, trocando ou libertando iões. Apesar de não apresentar vitalidade ou capacidade de neoformação, dentro da cavidade oral consegue estabelecer interpelações iónicas e, assim, mudar a sua estrutura cristalina (West & Joiner, 2014). O arranjo molecular destes cristais constitui-se por um grupo hidroxilo, representado por 3 iões cálcio separados uniformemente, em que à sua volta encontram-

se 3 íons fosfato, espaçados igualmente entre si. Depois 6 íons cálcio englobam os íons fosfato, formando um hexágono (Figura 5).

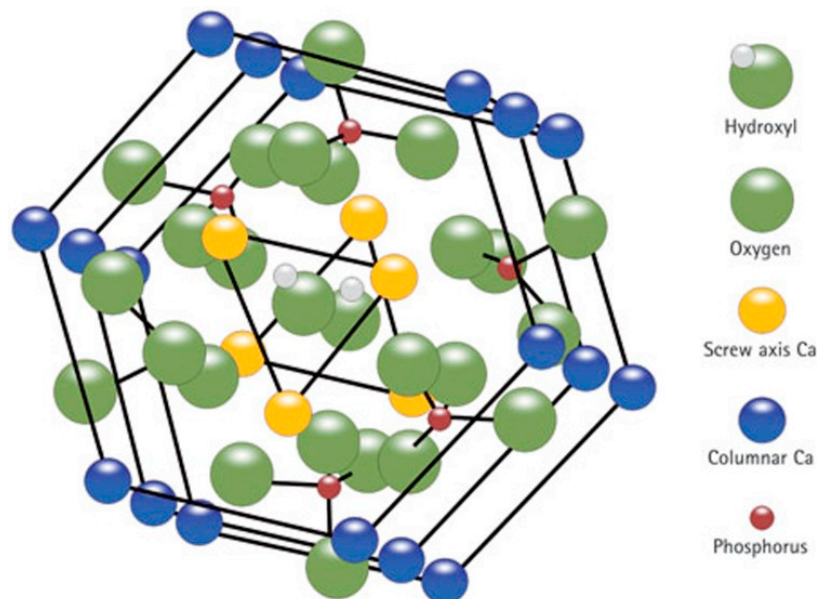


Figura 5 - Diagrama ilustrativo da estrutura da hidroxiapatite (Adaptado de Mazumder et al., 2016)

A hidroxiapatite pode sofrer alterações nos seus centros catiónicos e aniônicos. Nos locais do ligando do Ca^{2+} , pode ocorrer a substituição por magnésio (Mg^{2+}). Já nos centros aniônicos OH^- , PO_4^{3-} , pode haver uma substituição por fluoretos (F^-) ou cloretos (Cl^-) na posição do hidroxilo e carbonatos (CO_3^{2-}) em ambas as posições. Foi descrito que os cristais de hidroxiapatite apresentam quantidades de oligoelementos como, cloro, magnésio, sódio, cobre, potássio, ferro, estrôncio, entre outros ($\geq 1000\text{ppm}$); e ainda níquel, lítio, prata, arsênio, selênio, nípcônio, mercúrio, entre outros ($\leq 100\text{ppm}$) (Teruel, Alcolea, Hernández, & Ruiz, 2015).

As apatites biológicas são altamente solúveis, adaptando-se sempre ao meio em que estão. Tanto as apatites presentes nos dentes, como nos ossos, por exemplo, não se encontram na sua forma estereoquímica. Normalmente encontram-se com deficiências no cálcio. Os grupos fosfato (PO_4^{3-}) acabam por ser protonados (HPO_4^{2-}) e/ou substituídos por CO_3^{2-} , mantendo assim a eletroneutralidade aquando da depleção do Ca^{2+} (Ortiz-Ruiz et al., 2018).

Estas substituições acabam por afetar a estrutura do cristal, diminuindo a sua simetria resultando numa diminuição da energia de ligação, e conseqüente maior solubilidade (Lacruz et al., 2017).

A apatite carbonatada é uma apatite muito mais suscetível à dissolução acídica, como em meios com valores aproximados de pH 5, formados em norma pela atividade metabólica de bactérias cariogénicas. Já uma apatite fluoretada, fluoroapatite (FA), consegue resistir a meios mais acídicos, com valores próximos de pH 4, sem sofrer dissolução. Este fenómeno acontece porque, o ião F⁻ incorpora-se perfeitamente no cristal, estabilizando a simetria hexagonal, reduzindo a sua solubilidade em cerca de 3 graus de magnitude (Lacruz et al., 2017).

2. Saliva

2.1. Composição da Saliva

A saliva tem um papel fundamental na manutenção da saúde oral. Esta importância advém da interação que a saliva tem com as estruturas e superfícies da mucosa oral. Contém inúmeras moléculas, proteínas e glicoproteínas, que servem de nutrientes para a microbiota oral. No entanto, devido à capacidade antimicrobiana e pela ação enzimática, em conjunto com a flora microbiana, a saliva impede igualmente uma colonização ilimitada por microorganismos exógenos, existindo cerca de 10⁹/ml variedades de microorganismos (van't Hof, Veerman, Nieuw Amerongen, & Ligtenberg, 2014 ; Proctor, 2016).

As glândulas salivares são a estrutura que produzem a saliva, sendo assim, classificadas com glândulas exócrinas (Proctor, 2016). Existem as glândulas salivares maior (parótida, submandibular e sublingual) e as minor (Figura 6). Enquanto que nas glândulas maior a saliva é produzida através de estímulos externos (saliva estimulada), como visuais e olfativos, a saliva produzida das glândulas minor é continuamente libertada durante grande parte do dia e noite (saliva não estimulada) (Eliasson & Carlén, 2010).

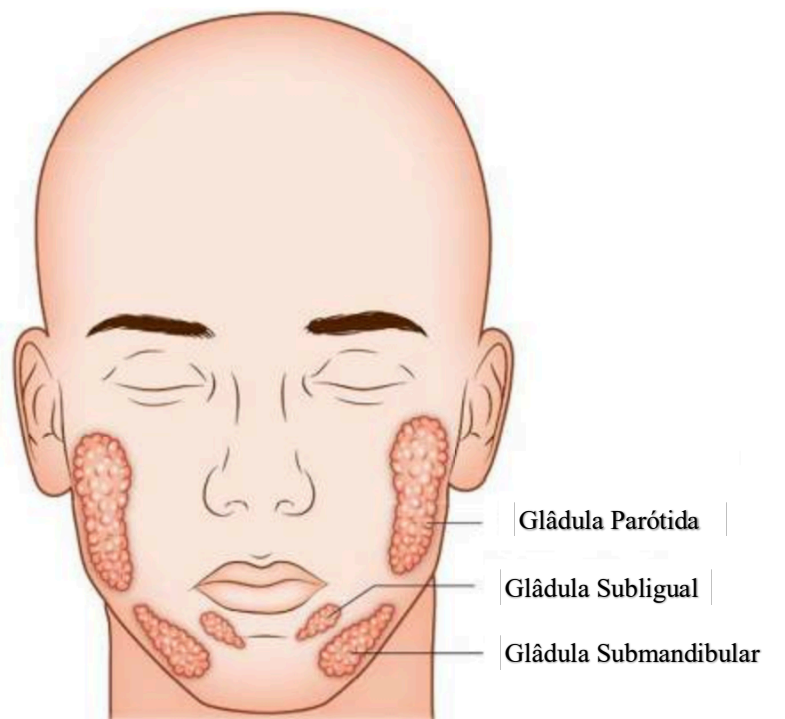


Figura 6 - Ilustração da localização das Glândulas Salivares (Adaptado de Maruyama, Monroe, Hunt, Buchmann, & Baker, 2019).

A saliva é construída principalmente por água (98%), contendo ainda outros componentes de extrema importância. Existem mais de 1000 proteínas identificadas na saliva, no entanto, as mais abundantes são as proteínas ricas em prolina (PRP), a amilase salivar, as mucinas, a IgA secretória, a anidrase carbônica e os péptidos microbianos. As mucinas representam mais de 15% do conteúdo proteico da saliva e representam a principal fonte de açúcares para o crescimento de bactérias na mucosa oral, já que a galactose, a manose, a fucose, a N-acetilgalactosamina, a N-acetilglucosamina e o ácido siálico são os principais constituintes destas proteínas. A saliva contém também alguns elementos inorgânicos, bicarbonatos e fosfatos (que são agentes tampão) ureia, entre outros (Marsh et al., 2016; Mothey, Buttaro, & Piggot, 2014).

2.2. Propriedades da Saliva

A saliva possui variadíssimas propriedades, algumas fundamentais para a saúde geral e oral. A saliva tem como função o *wash out* e a lubrificação das estruturas da cavidade oral; intervém na formação da película adquirida; a manutenção do pH oral, através da sua capacidade tampão; a remineralização das superfícies dentárias e prevenção da desmineralização; tem ação antimicrobiana; ajuda no paladar e na formação

do bolo alimentar para ajudar a deglutição de alimentos; inicia a digestão enzimática e é muito importante para a mastigação, deglutição e para a fala (Tabela 1) (Figura 7) (Pedersen, Sørensen, Proctor, Carpenter, & Ekström, 2018).

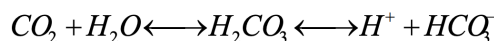
A quantidade de saliva produzida pelas glândulas salivares, é, diariamente, entre 1 e 1,5L sendo que, a saliva estimulada corresponde a 1,0 a 2,0mL por minuto (em média) enquanto que a não estimulada corresponde a 0,2 a 0,5mL por minuto (em média). A diferença entre sexos também existe, sendo mais frequente ser maior nos homens (Humphrey & Williamson, 2001; Silva et al., 2016). Quando os valores se encontram diminuídos podemos estar perante uma hipossalivação.

Hipossalivação, ou hipossalialia, chama-se ao estado que existe uma diminuição do fluxo salivar, quer da saliva estimulada ou não estimulada, podendo estar associada a patologias, nomeadamente das glândulas salivares, principalmente quando associado a cancro da cabeça e pescoço envolvendo tratamento por radioterapia, ou anomalias endócrinas e autoimunes. Pode-se ainda associar esta disfunção à toma de medicamentos, nomeadamente, anti-hipertensores, antidepressivos e anti-histamínicos. Nestes casos, existe um risco mais elevado para a formação de lesões de cárie. Uma vez que pode ocorrer desmineralização das superfícies, pela biodisponibilidade insuficiente de iões cálcio e/ou fosfato e pela insuficiente *clearance* salivar para ácidos e açúcares (Silva et al., 2016).

As superfícies sólidas da cavidade oral estão cobertas por uma película, identificada como película adquirida. Esta película é constituída por proteínas e glicoproteínas, como a prolina, estatina e histatina, que se aderem às superfícies, formando uma película protetora. Esta película, por norma, tem entre 10-20nm de espessura, e a sua eficácia é tanto maior quanto maior a espessura, sendo identificado como a zona lingual dos dentes inferiores a que apresenta uma maior espessura de película adquirida, uma vez que estão em constante contato com a saliva secretada das glândulas submandibular e sublingual (van't Hof et al., 2014).

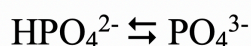
Para além de fisiologicamente se controlar a população de microorganismos através do engolir, mastigar e falar e, ainda, pela higiene oral, a formação desta camada proteica consegue também a manutenção da população de microorganismos. Desta forma, o impedimento das bactérias se aderirem às superfícies dentárias, protege estas superfícies contra a desmineralização causada pelos ácidos da atividade metabólica microbiana e dos alimentos (Buzalaf et al., 2012).

A capacidade tampão da saliva, quer da estimulada quer da não estimulada, é importante para a manutenção do pH oral. Esta capacidade baseia-se em três grandes sistemas tampão. O primeiro, e mais importante, é o sistema tampão ácido carbónico/bicarbonato, simplificado traduz-se na seguinte formula:



Este sistema é difícil de perceber a sua dinâmica uma vez que envolve o dióxido de carbono dissolvido na saliva. O aumento da concentração de CO_2 (proveniente principalmente da respiração oral ou pela ingestão de alimentos) é dependente do aumento da concentração do ácido carbónico (H_2CO_3). O bicarbonato (HCO_3^-) salivar aumenta o pH e, conseqüentemente, a capacidade tampão, nomeadamente na secreção da saliva estimulada (Zabokova Bilbilova, Sotirovska Ivkovska, Georgiev, & Stefanovska, 2013).

O segundo sistema tampão é o sistema dos fosfatos, que é bastante importante em casos de baixa taxa de fluxo de saliva. Este sistema utiliza o HPO_4^{2-} , que se encontra em maiores quantidades na saliva não estimulada em comparação com a saliva estimulada, que se liga a um protão para formar $H_2PO_4^-$. Este sistema, em conjunto com o sistema tampão bicarbonato, mantém o pH da cavidade oral acima de 6. Dependendo do pH oral, podem estar presentes diferentes formas do ião fosfato. No pH fisiológico da cavidade oral a forma mais encontrada deste ião é o di-hidrogenofosfato ($H_2PO_4^-$) e o hidrogenofosfato (HPO_4^{2-}) (Bardow, Moe, Nyvad, & Nauntofte, 2000).



Ainda se pode considerar um terceiro sistema tampão, presente na saliva. A saliva é constituída por diversas proteínas que, para além de variadíssimas funções distintas entre elas, tem ainda a capacidade de impedir grandes variações de pH na saliva. Quando o ponto isoelétrico destas proteínas está acima ou abaixo, o pH tende a ser adaptado (Bardow et al., 2000).

Como já foi mencionado, a saliva e a estruturas dentárias realizam uma série de trocas iónicas. A saliva representa assim um grande sistema de ganho e/ou perda iónica,

já que tem a tarefa da manutenção dos níveis supersaturados de cálcio e fosfato, em relação aos cristais de hidroxiapatite (Li, Wang, Joiner, & Chang, 2014).

Estes iões, tão importantes para a estrutura cristalina do esmalte, aquando da existência de uma desmineralização, são enviados da saliva e do biofilme dentário, de forma passiva para a superfície dentária desmineralizada (Li et al., 2014).

Por outro lado, ocorrendo uma variação de pH abaixo do valore 5,5 devido a um ataque ácido, resulta numa dissolução dos cristais de hidroxiapatite, uma vez que, existe um aumento da solubilidade dos cristais. Sendo o pH crítico da saliva a 5,5, correspondente ao limite em que a saliva consegue efetuar uma ação protetora, todos os valores abaixo deste irão promover a perda da estrutura cristalina do esmalte (West & Joiner, 2014).

Contudo, a capacidade remineralizadora da saliva não é tão eficaz quando comparada com produtos remineralizantes sintéticos. Este facto prende-se pela presença de proteínas, como a estaterina e as proteínas ricas em prolina, que interferem na nucleação e o crescimento dos cristais de hidroxiapatite (Pateel, Gunjal, Math, Murugeshappa, & Nair, 2017).

Tabela 1 - Funções dos vários componentes da saliva (Adaptado de García-Godoy & Hicks, 2008)

Função	Componentes da Saliva
Remineralização	Glicoproteínas ricas em prolina, estaterinas, cálcio, fosfatos, fluoretos, mucinas
Capacidade Tampão	Bicarbonatos, fosfatos, anidrase carbónica, sialina, proteínas alcalinas, urease
Digestão	Amílases, lípases, protéases, DNAses, RNAses
Lubrificação	Mucinas, Glicoproteínas ricas em prolina
Agregação e <i>clerance</i> dos microorganismos	Mucinas, lactoferrinas, imunoglobulina A, Glicoproteínas ricas em prolina, estaterinas, lisozimas
Agentes Antimicrobianos	Mucinas, lisozimas, lactoferrinas, lactoperoxidases, histatinas, cistatinas, aglutininas, defensinas, catelicidina, Glicoproteínas ricas em prolina
Agentes Antifúngicos e Antivirais	Imunoglobulinas (principalmente o tipo A), mucinas, histatinas
Formação do Bolo Alimentar	Mucinas
Paladar	Mucinas, zinco

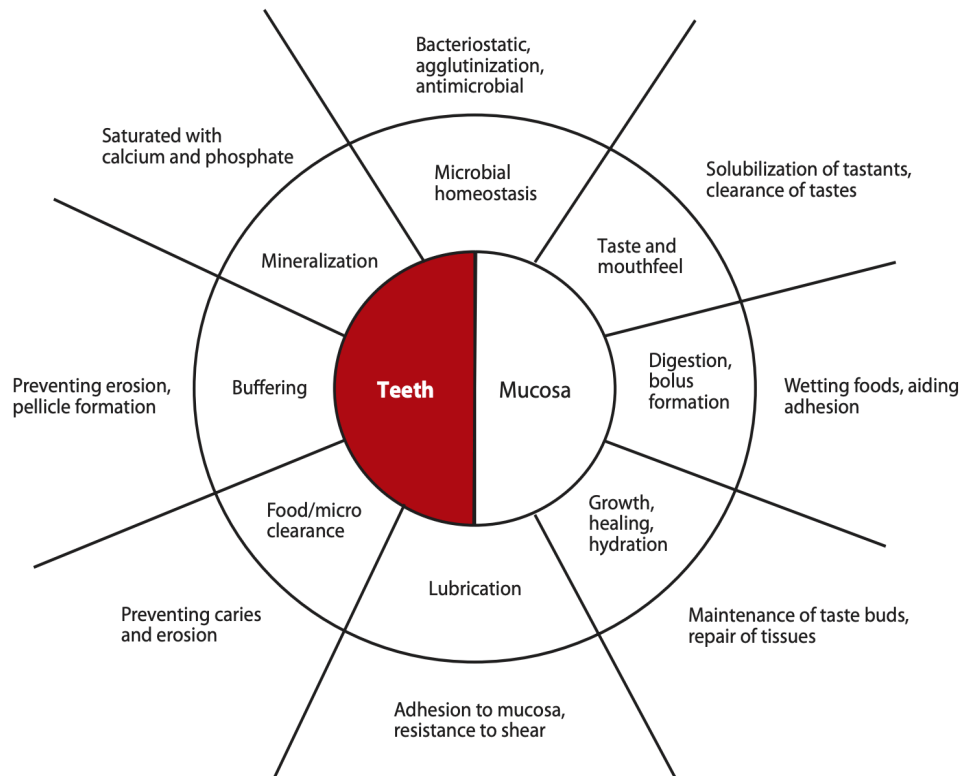


Figura 7 - Funções da Saliva (Adaptado de Carpenter, 2013)

2.3. Saliva Artificial

Em estudos *ex vivo* consegue-se avaliar várias condições biológicas e extrapolar, muitas vezes, os resultados para os sistemas biológicos. No caso do estudo da desmineralização/remineralização, apesar de poder serem feitos num curto espaço de tempo, terem custos reduzidos, e não ser necessária a colaboração de indivíduos, não se consegue mimetizar alguns sistemas biológicos, como é o caso da saliva (Batista, Torres, Sener, Attin, & Wiegand, 2016).

O uso de saliva artificial acarreta dificuldades e limitações, como por exemplo, o tempo de recolha e pela sua decomposição rápida, o que levou à formulação de soluções que pudessem diminuir estas falhas (Maske, van de Sande, Arthur, Huysmans, & Cenci, 2017), surgindo então soluções de saliva artificial formulada para simular a saliva natural.

Existem bastantes formulações para a saliva artificial, muitas para diferentes tipos e desenhos de estudos (Ionta et al., 2014; J Pytko-Polonczyk, Jakubik, Przeklasa-Bierowiec, & Muszynska, 2017), porém também o seu uso é limitado, pela sua composição química e por não formação da película adquirida, uma função bastante importante da saliva natural, sendo um dos fatores protetores principais da doença de cárie (X. Wang et al., 2011). Ainda assim, é demonstrada a sua eficácia no aumento da dureza

do esmalte que sofreu desmineralização em estudos *ex vivo* podendo ser assim usada neste tipo de estudos como excelente meio remineralizador, tal como a saliva natural atua (Aykut-Yetkiner, Wiegand, & Attin, 2014).

3. Cárie Dentária

A cárie dentária é uma doença crónica sendo uma das mais prevalentes em todo o mundo. É caracterizada por ser uma doença complexa (Figura 8). Ainda se pode considerar como dinâmica e multifatorial, ou seja, resulta da interação do tecido dentário com o meio, manifestando-se clinicamente através de uma lesão de cárie, cavitada ou não (Tao et al., 2018; Featherstone, 2000).

Pelo seu carácter lento e progressivo, esta pode se desenvolver desde a erupção dentária, afetando a superfície do esmalte, inicialmente, em níveis subclínicos, não cavitada, (*white spots*) (S Molnar & Gantt, 1977) até afetar estruturas mais profundas do dente, como a dentina, até chegar à completa destruição do dente, podendo ser interrompida a qualquer momento (Peres et al., 2019; Tao et al., 2018; Lamont & Eglund, 2015; Featherstone, 2000).

As recorrentes desmineralizações e remineralizações que ocorrem na superfície dentária, ao longo do tempo, perdurando a desmineralização afetando este equilíbrio, pode-se desenvolver lesões de cáries. Estas são principalmente causadas pela interação entre os ácidos produzidos pelas bactérias anaeróbias do biofilme e a superfície de esmalte, pelos fatores do hospedeiro e pela saliva, sendo assim considerada uma doença multifatorial (Pitts et al., 2017; Lamont & Eglund, 2015). Os indivíduos podem estar mais suscetíveis a progressão da doença, podendo ser afetados por fatores intrínsecos e por fatores extrínsecos. São exemplos de fatores intrínsecos: a capacidade tampão, o fluxo e/ou a composição da saliva, fatores genéticos ou imunológicos. Já os fatores extrínsecos caracterizam-se pela condição socioeconómica, pelo estilo de vida e educação a que o indivíduo está sujeito (Pitts et al., 2017; J. Featherstone, 2008).

Além destes fatores já mencionados, fatores comportamentais também devem ser considerados para a progressão de cárie. O tipo de higiene oral e a técnica utilizada, os hábitos alimentares e o tipo de alimentos ingeridos e/ou medicamentos que contenham açúcar na sua constituição são fatores potenciadores do risco de cárie (Selwitz et al., 2007).

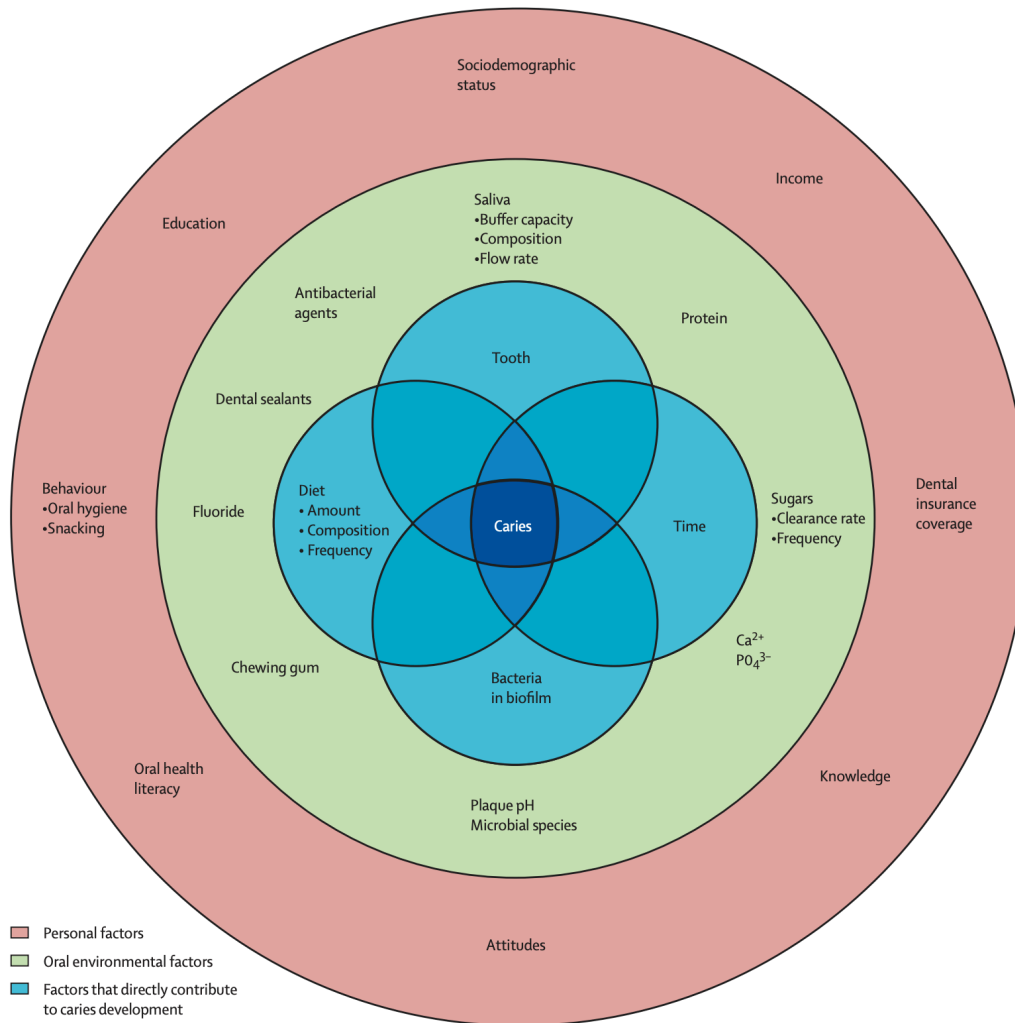


Figura 8 - Ilustração dos fatores que contribuem para o desenvolvimento da doença de cárie (Adaptado de Selwitz et al., 2007)

3.1. Aspectos Bioquímicos

O meio ambiente da cavidade oral provoca interações com o esmalte, principalmente a saliva, maior constituinte deste meio. A saliva, neste caso, é um dos principais intervenientes nos aspetos bioquímicos da cárie (Selwitz et al., 2007).

A primeira manifestação da doença de cárie nas superfícies dentárias manifesta-se por uma desmineralização dos cristais de hidroxiapatite. Neste caso, a desmineralização resulta do contacto da superfície dentária com os produtos metabólicos das bactérias, ácidos, mas também pela dieta que se pratica e ainda a suscetibilidade de cada individuo. As lesões de cárie, se não tratadas com o fim de diminuir a progressão, ou até mesmo neutralizar a lesão, podem dar origem a lesões irreversíveis (Nigel B Pitts et al., 2017; Selwitz et al., 2007; West & Joiner, 2014).

A recorrente flutuação de pH da cavidade oral promove a desmineralização e remineralização constante da superfície dentária. Esta situação ocorre devido ao metabolismo dos hidratos carbono fermentáveis pelas bactérias anaeróbias e pelos ácidos, produzidos como produto final do seu metabolismo ou provenientes da alimentação. Ainda estão envolvidos neste processo o fluxo de iões cálcio e fosfato, que entram e saem dos dentes (Selwitz et al., 2007; Li et al., 2014). Este sistema tende a dar-se de forma contínua e cíclica, desde que, na cavidade oral se mantenha o equilíbrio entre os fatores patológicos e os fatores protetores (J. Featherstone, 2008).

Existindo uma diminuição contínua do pH, sem reversão, para valores a baixo de 5,5, resultado dos produtos metabólicos acídicos, principalmente das bactérias *Lactobacillus spp.*, *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus*, estamos na presença de aumento do fenómeno de desmineralização, sobrepondo-se ao de remineralização (Niu et al., 2014; Nigel B Pitts et al., 2017).

Mas não só pelos produtos metabólicos das bactérias se formam lesões de cárie. É necessário que o individuo afetado tenha suscetibilidade para a doença, ocorra desequilíbrios entre os fatores que protegem contra a cárie e os que a desencadeiam, num período de tempo suficiente, para que o sistema desmineralização-remineralização deixe de estar em equilíbrio, promovendo-se a desmineralização, originando uma dissolução da matéria mineral (Peres et al., 2019; Nigel B Pitts et al., 2017; Selwitz et al., 2007; X. Wang et al., 2011).

A reversão do pH a valores fisiológicos, ou seja, a cima de 5,5, através de um equilíbrio alimentar e pela remoção da placa bacteriana, ou até mesmo pela capacidade tampão da saliva, a dissolução dos cristais de hidroxiapatite é cessada, e em muitos casos revertida, havendo maior equilíbrio entre remineralização e desmineralização (Marsh et al., 2016; West & Joiner, 2014).

Dos fatores protetores pode-se salientar: a saliva, salientado o seu fluxo e os seus componentes; a presença de agentes remineralizantes externos (para além da saliva), como o fluor; ou ainda a presença de agentes antibacterianos, como é o caso da clorhexidina. Já fatores patológicos pode-se considerar: presença de bactérias cariogénicas; dieta rica em hidratos de carbono fermentáveis; e ainda disfunções das glândulas salivares (Figura 9) (J. Featherstone, 2008; Pitts et al., 2017; Peres et al., 2019).

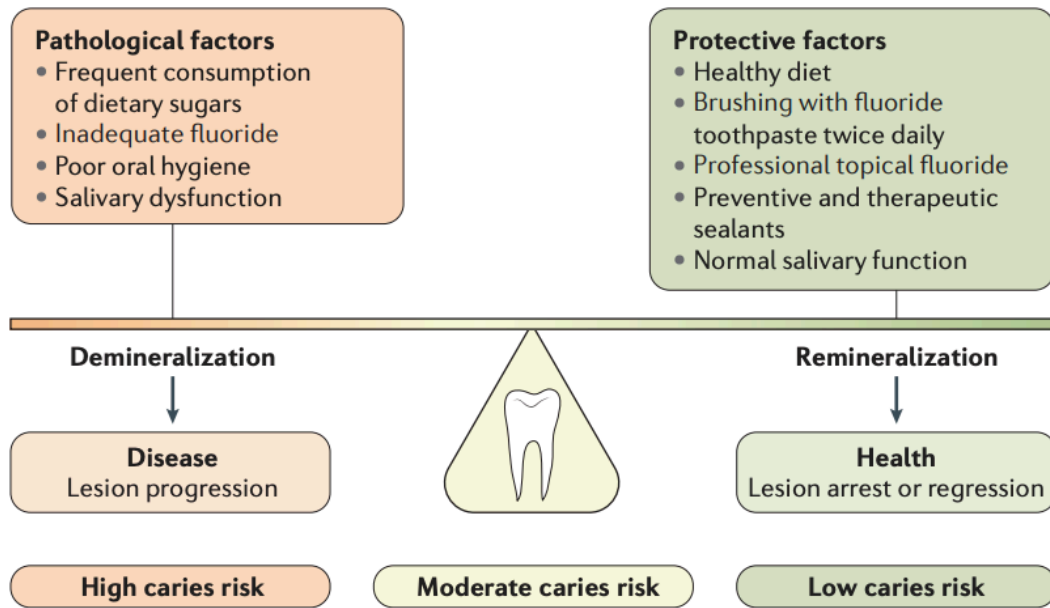


Figura 9 - Conceito de equilíbrio da cárie, mostrando o equilíbrio entre fatores patogénicos e fatores protetores (Adaptado de Pitts et al., 2017)

3.2. Aspetos Histológicos

A nível patológico, a cárie dentária desenvolve-se de forma gradual, iniciando-se por lesões subclínicas, não detetáveis a nível clínico, e progride, passando por lesões visíveis, chegando a lesões profundas, podendo levar a completa destruição do dente (Llena, Leyda, & Forner, 2015; Selwitz et al., 2007).

A presença destes ácidos, mais concretamente os ácidos láctico, acético, fórmico e/ou propanoico, provocam a diminuição do pH, aproximando-se do pH crítico do cristal de hidroxiapatite de 5,5. Neste caso, os cristais de hidroxiapatite tendem a dissolver-se, libertando para o meio (saliva e placa bacteriana), iões de fosfato e cálcio (Selwitz et al., 2007; West & Joiner, 2014).

Histologicamente, o esmalte apresenta porosidades, provocadas pela desmineralização da matriz mineral. Estas zonas porosas, desmineralizadas, facilitam que os ácidos provenientes das bactérias e da dieta impregnem nestas zonas, difundindo a desmineralização (Abdullah & John, 2016; Meyer-Lueckel & Paris, 2016).

A saliva que se encontra no meio é um remineralizante natural, incorporando na estrutura desmineralizada iões cálcio, fosfato e fluor, formando assim nova matriz mineral. A substituição do ião carbonato pelo ião fosfato torna o cristal de hidroxiapatite mais solúvel. Já uma incorporação do fluor torna o cristal mais resistente à dissolução.

Havendo ácido no meio, estes levam à dissolução do cristal, libertando estes iões (J. Featherstone, 2008; Nigel B Pitts et al., 2017; West & Joiner, 2014).

Inicialmente na desmineralização do esmalte a níveis subclínicos, não cavitada, existe um aumento dos poros intercristalinos, com perdas de matéria mineral em cerca de 50%. O esmalte, clinicamente apresenta-se com uma tonalidade diferente, apresentando no entanto, uma estrutura intacta (Zamorano Pino, Valenzuela Aránguiz, Vial Prado, & Vidal Tardón, 2015).

3.3. Manifestações Clínicas

As lesões de cárie podem apresentar-se de várias formas, sempre relacionadas com o seu grau de extensão e estruturas que afeta, e pelos sinais de lesão ativa ou inativa (Figura 10). Inicialmente manifesta-se, geralmente, por uma lesão branca, designada de *white spot lesion* (WSL). Estas são definidas por serem manchas bem definidas, havendo uma diferença significativa do esmalte sã, distribuídas aleatoriamente, relacionadas com os primeiros sinais de desmineralização (Abdullah & John, 2016). Esta desmineralização causa alterações nas propriedades óticas, apresentando um esmalte mais opaco e esbranquiçado. Apresentam-se ainda ativas quando clinicamente se apresentam rugosas e com uma aparência semelhante ao giz (*chalky*), ou inativas quando são brancas, lisas, duras brilhantes (Pathak, Roopa, Poornima, & Neena, 2015; Torres, Borges, Torres, Gomes, & De Oliveira, 2011).

Com a progressão da doença, e conseqüente agravamento da mesma, esta atinge níveis mais profundos do dente, chegando à dentina e por último a polpa. Na dentina quando é uma lesão ativa apresenta-se como uma cor amarelada a acastanhada, mole e rugosa. Quando é inativa já se apresenta como uma lesão escura, dura e lisa (Pitts, 2004).

Para além das WSL, existem outras manchas brancas que se apresentam nas superfícies dentárias, às quais se deve fazer o diagnóstico diferencial para estas lesões. Podem existir manchas brancas de fluorose ou hipoplasias do esmalte. A fluorose é caracterizada por manchas indefinidas, distribuídas por forma homóloga entre os dentes (Bishara & Ostby, 2008). A hipoplasia de esmalte designa-se como uma incompleta ou malformação do esmalte, caracterizado por manchas brancas e/ou descolorações da superfície dentária, podendo variar de amarelo a castanho escuro, uma superfície rugosa e irregular e ainda podem apresentar depressões ou sulcos, fazendo com que exista exposição de dentina, por ausência parcial ou total do esmalte (Souza et al., 2010).

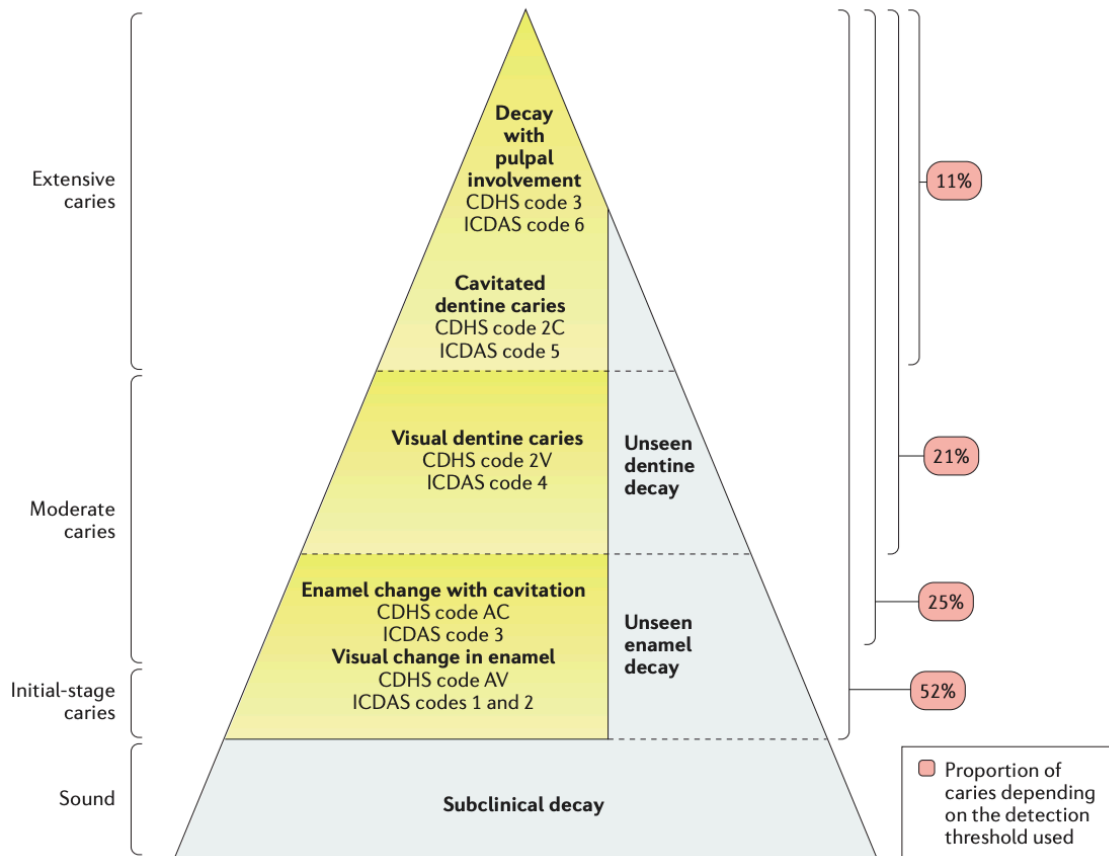


Figura 10 - Diferentes classificações para estádios da doença de cárie (Adaptado de (Nigel B Pitts et al., 2017))

3.4. Diagnóstico e Índices de Classificação

Para se fazer um correto diagnóstico, a avaliação do risco, o rastreio e a prevenção da doença de cárie é necessário conhecer concretamente e corretamente quais são as características clínicas destas lesões, bem como as diferentes localizações e estádios que possam ter (N. Pitts, Melo, Martignon, Ekstrand, & Ismail, 2011; Nigel B Pitts et al., 2017).

Para este mesmo correto diagnóstico, pode-se considerar duas abordagens diferentes: diagnóstico clínico e o diagnóstico epidemiológico (N. Pitts et al., 2011; N.B. Pitts, 2004). No diagnóstico clínico, tem como base a identificação da lesão de cárie (ou lesões de cárie) presentes em um individuo, bem como verificar qual a progressão e atividade da lesão. Assim, com, um correto diagnóstico e planeamento, consegue-se planear um correto tratamento (N.B. Pitts, 2004). Por outro lado, no diagnóstico epidemiológico, este centra-se na recolha de dados, sendo estes analisados segundo a

etiologia, incidência, prevalência e grau de gravidade da doença. Sendo esta uma análise epidemiológica, consegue-se prever as necessidades de um conjunto de indivíduos, prevendo quais as suas necessidades. Assim, segundo o que pode ser apurado nestes estudos, padroniza-se os critérios a serem utilizados na avaliação de um indivíduo (N.B. Pitts, 2004; Nigel B Pitts et al., 2017; Young et al., 2015).

Nos estudos epidemiológicos deve-se apurar a identificação das lesões não cavitadas, uma vez que, como já referido, um diagnóstico precoce, promove a não progressão da doença, podendo atenuá-la. Assim, com estes critérios padronizados, é possível que estes estudos sejam válidos e fiáveis. (N. Pitts et al., 2011; N.B. Pitts, 2004; Yadav & Prakash, 2016).

Como métodos de diagnóstico há variadíssimos métodos, e com o avançar da investigação científica e a tecnologia, existem cada vez mais métodos mais precisos. Para além dos métodos mais tradicionais como a exploração visual e tátil, com auxílio de sonda exploratória, métodos radiográficos, convencionais ou digitais, existem ainda a transiluminação com fibra ótica (FOTI), condutividade elétrica (ECM) ou a fluorescência (DIAGNOdent) (Guerrieri, Gaucher, Bonte, & Lasfargues, 2012).

No âmbito da investigação epidemiológica, atualmente o sistema mais utilizado é o ICDAS II (*Internacional Caries Detection and Assessment System II*). Este sistema pode ser igualmente utilizado na prática clínica para classificar lesões de cárie. Com este método pretendeu-se criar uma padronização como método de diagnóstico, que englobam desde a detenção dos estágios iniciais de cárie até à completa exposição da dentina. Ou seja, este sistema avalia a atividade e a gravidade destas lesões (Nigel B Pitts et al., 2017; Selwitz et al., 2007).

O ICDAS II caracteriza-se por dois dígitos. O primeiro dígito refere-se ao estado que a superfície dentária apresenta, íntegra ou restaurada, enquanto que o segundo dígito refere-se a existência de uma lesão de cárie e em que estado se traduz (Tabela 2 e 3) (Ismail et al., 2007).

Tabela 2 - Critérios associados ao estado da superfície dentária baseados no ICDAS II

Códigos	Descrição dos Critérios Clínicos
Código 0	Não restaurado nem selado
Código 1	Parcialmente selado
Código 2	Totalmente selado
Código 3	Restauração da cor do dente
Código 4	Restauração a amálgama
Código 5	Coroa metálica
Código 6	Coroa cerâmica, ouro, metalo-cerâmica ou faceta
Código 7	Restauração fraturada ou perdida
Código 8	Restauração provisória
Códigos Especiais	Descrição
Código 96	Superfície dentária que não pode ser examinada
Código 97	Dente em falta devido a cárie
Código 98	Dente em falta por outras razões
Código 99	Não erupcionado

Tabela 3 - Critérios associados à presença ou não de cárie e ao seu estado, baseados no ICDAS II

Códigos	Descrição dos Critérios Clínicos
Código 0	Esmalte saudável
Código 1	Alterações de esmalte visíveis com esmalte seco
Código 2	Alterações inequívocas de esmalte visíveis
Código 3	Cavidade do esmalte sem dentina visível
Código 4	Sombra escura de dentina vista do esmalte sem cavidade
Código 5	Cavidade com exposição da dentina
Código 6	Extensa cavidade com exposição da dentina

3.5. Epidemiologia

Nos últimos anos é cada vez mais evidente a necessidade da realização de estudos epidemiológicos sobre a doença de cárie, a nível mundial. Estes centram-se na obtenção de dados para que exista uma uniformidade na recolha de dados, tais como, a prevalência, realçando os dados significativos para diferentes taxas etárias para uma melhor quantificação da doença, existência de novos casos, incidência, (avaliando a progressão), num período de tempo (Nigel B Pitts et al., 2017).

A doença de cárie é, nos dias atuais, um grave problema de saúde pública, afetando maioritariamente os países desenvolvidos e industrializados, existindo cerca de 60-90% da população que apresenta sinais desta doença (Nigel B Pitts et al., 2017). No entanto tem se verificado um progressivo decréscimo na prevalência, apesar de nos grupos de risco como, grupos socioeconómicos desfavorecidos, minorias étnicas e sociais, crianças, idosos e migrantes se verificar taxas de prevalência ainda elevadas (Nigel B Pitts et al., 2017; Selwitz et al., 2007). Estas discrepâncias da saúde relacionadas com a situação social dos indivíduos deve-se sobretudo à falta de medidas específicas de saúde, nomeadamente preventivas (Bagramian, Garcia-Godoy, & Volpe, 2009). Além deste aspeto fundamental, o êxodo rural, migração das zonas rurais para as cidades, fomenta um estilo de vida diferente, como na alimentação, por exemplo (Bagramian et al., 2009; Nigel B Pitts et al., 2017).

Em Portugal, foi realizado um estudo que pesquisava a prevalência da doença de cárie e a necessidade de tratamento em crianças e adolescentes, com idades de 6, 12 e 18 anos (correspondentes às idades da utilização do cheque-dentista). Este estudo, abrangido pelo III Estudo Nacional de Prevalência de Doenças Orais, contava com uma amostra de 3710 indivíduos, em que foram inquiridos através de questionário sobre a saúde oral, bem como os dados sociodemográficos. Avaliaram também clinicamente a presença de lesões de cárie através do ICDAS II. Os resultados revelaram que as crianças com 6,12 e 18 anos apresentavam uma prevalência de cárie de 45,2%, 47%, e 67,6% respetivamente, mostrando assim que as medidas adotadas pelo Programa Nacional de Saúde Oral tem afetado positivamente estes resultados (Calado, Ferreira, Nogueira, & Melo, 2017).

A nível global, os indivíduos que apresentam lesões de cárie por tratar, na dentição definitiva, representa cerca de 35% da população mundial, correspondendo assim a 2,4 mil milhões de indivíduos (Nigel B Pitts et al., 2017).

3.6. Prevenção

O objetivo das políticas de saúde pública, no que respeita à prevenção da doença de cárie, é a preservação da superfície dentária, livre de lesões de cárie, prevenindo a desmineralização de origem extrínseca, promovendo os processos naturais reparadores (Ismail et al., 2007).

A prevenção à população pode ser efetuada através de políticas de saúde, regulamentação e legislação específica e, ainda, pela educação para a saúde oral, fomentando comportamentos saudáveis (J. Featherstone, 2008; Nigel B Pitts et al., 2017; Selwitz et al., 2007)

Como medidas, podem-se adotar as que afetam a população como um todo, como por exemplo, flouretação das águas ou legislação para os alimentos açucarados, uma vez que esta medida atinge toda a população, de todos os escalões socioeconómicos, protegendo principalmente os grupos de risco. A este nível encontramos então alguns fatores que aumentam o risco de doença de carie como, um orçamento familiar baixo, em que a saúde oral tende a ser última opção; acesso precário a cuidados de saúde; baixa exposição a fluoretos; e iliteracia na saúde, principalmente na saúde oral (Nigel B Pitts et al., 2017; Selwitz et al., 2007).

Os estudos epidemiológicos que têm sido efetuados permitiram que se identifique exatamente quais são os grupos de maior risco de contrair a doença de cárie. Grupos como: indivíduos imunocomprometidos (leucemia ou infeção pelo vírus da imunodeficiência humana – HIV); indivíduos com deficiência cognitivas ou motoras (dificultando a eficácia da higiene oral); desordens a nível genético que impliquem estruturas orais (lábio leporino ou fenda palatina, displasia ectodérmica); disfunções salivares (Síndrome de Sjögren, diabetes *mellitus*, medicação que cause xerostomia ou até mesmo hipossalivação – por exemplo, anti-histamínicos) (Nigel B Pitts et al., 2017).

Como a doença por cárie tem uma etiologia multifatorial, todas as intervenções para a prevenção desta doença devem associar-se à prevenção para a saúde oral e aos programas de prevenção de doenças crónicas, já que partilham fatores de risco comuns (Nigel B Pitts et al., 2017).

Pode-se considerar três níveis de prevenção: prevenção primária, prevenção secundária e prevenção terciária. A prevenção primária considera-se o equilíbrio fisiológico, bons e adequados hábitos de higiene oral, dieta equilibrada, escovagem eficaz dos dentes e controlo da placa bacteriana com as necessárias consultas de medicina

dentária. Quando existe um desequilíbrio no estado fisiológico, passamos para um estado patológico, em que aplicamos medidas da prevenção secundária, realizando um diagnóstico precoce e um tratamento adequado. Quando a doença de cárie está instalada, deve-se proceder a tratamentos ao fim de eliminar as lesões de cárie, por meio de métodos restauradores. A este nível estamos perante uma prevenção terciária (Albano, D'Ivernois, de Andrade, & Levy, 2019).

3.7. Tratamento de Lesões de Esmalte não Cavidadas

A prática da medicina dentária nos dias atuais baseia-se numa visão preventiva e minimamente invasiva, direcionando-se para tratamentos que tenham a capacidade de controlar ou até reverter as lesões de cárie, neste caso as que não apresentam cavitação. Deste modo, avaliação de cada lesão deve ser ponderada, diagnosticando e efetuando o tratamento mais adequado àquela lesão (Farooq, Moheet, Imran, & Farooq, 2013).

Apesar de naturalmente existir uma remineralização natural através da saliva, muitas vezes esta não é suficiente, devido a fatores extrínsecos e intrínsecos de cada indivíduo, podendo apresentar lesões incipientes de cárie, WSL (Abdullah & John, 2016).

Proceder a um diagnóstico apropriado e precoce, em combinação com as técnicas o menos invasivo possível, o tratamento das WSL é possível, através da remineralização. Estas lesões são identificadas como o primeiro sinal da doença de cárie, reconhecidas no ato clínico, a olho nu. É possível identificar como WSL pelo seu aspeto mais opaco, perda do brilho, superfície aparente mais rugosa (Indrapriyadharshini et al., 2018).

3.7.1. Remineralização das lesões de cárie

A remineralização, em suma, pode-se considerar que consiste num processo natural de restauro da matriz inorgânica, perdida no processo da lesão de cárie. A saliva, como remineralizante natural, tem uma forte responsabilidade da neutralização dos ácidos responsáveis por estas lesões, através de iões presentes na saliva, e de igual modo, a biodisponibilidade de principalmente iões cálcio e fosfato para remineralizar superfícies lesadas (Dawes, 2008; Warreth et al., 2019).

Apesar disso, muitas vezes esta remineralização acaba por não ser suficiente, já que apresenta algumas limitações, como, ser um processo lento e na presença de substâncias orgânicas nas lesões mais profundas dificultam o processo de remineralização (Singh, Singh, Goyal, Utreja, & Jena, 2016).

Assim, surgiu a necessidade de se desenvolverem produtos remineralizadores que prevenissem o desenvolvimento das lesões incipientes de cárie. Numerosas técnicas e tipos de agentes remineralizantes foram desenvolvidos e todos com resultados minimamente previsíveis, muitas usadas clinicamente, em que não permitem o avanço da lesão de cárie e remineralizar o tecido inorgânico perdido. Idealmente um agente remineralizante deve ter as seguintes características: que se difunda na subsuperfície e/ou liberte iões cálcio e fosfato; não liberte ião cálcio em excesso; não promova a formação de cálculos dentários; que atue em pH ácido; que atue em doentes com xerostomia; e potencialize o poder remineralizante da saliva (Arifa, Ephraim, & Rajamani, 2019).

Os agentes remineralizantes podem ser classificados em:

- Fluoretados
- Não-Fluoretados
 - Fosfato de Tricálcico Alfa (TCP) e Beta (TCP- β)
 - Fosfato de Cálcio Amorfo
 - Caseína Fosfopeptídica – Fosfato de Caseína Amorfo (CPP-ACP)
 - Fosfosilicato de Sódio Cálcio (Vidro Bioativo)
 - Xylitol
 - Fosfato de Dicálcio desidratado (DCPD)
 - Nanopartículas para remineralização
 - Nanopartículas de Fluoreto de Cálcio
 - Nanomateriais de Fosfato de Cálcio
 - Partículas de NanoHAP
 - Nanopartículas de ACP
 - Materiais de vidro nanobioativo
 - Polidopamina
 - Poliamida
 - Oligopeptidos
 - Teobromina
 - Arginina
 - Peptidos Auto-agregados
 - Remineralização induzida por campo elétrico (Arifa et al., 2019).

3.7.1.1. Flúor

A descoberta dos produtos fluoretados como agentes remineralizadores do esmalte e como prevenção contra a doença de cárie, foi uma das grandes descobertas em Medicina Dentária. A partir da segunda metade do séc. XX atribui-se o declínio da prevalência desta doença devido a aplicação de produtos de saúde oral fluoretados (Arifa et al., 2019).

A formulação tópica é a mais comum. Aquando da aplicação tópica de produtos fluoretados, o ião fluor reage com o ião cálcio presente na saliva, resultando num precipitado de fluoreto de cálcio (CaF_2) na zona superficial do esmalte, protegendo esta superfície e funcionando como reservatório para o flúor. Quando existe um fenómeno de desmineralização, encontrando-se assim o meio num pH diminuído, existe a troca dos iões do grupo hidroxilo por iões de flúor. Desta forma, o cristal presente no esmalte, com a troca de iões, passa de HA para cristal de Fluoroapatite (FA) (Mohammed, Lynch, & Anderson, 2014; Singh et al., 2016).

Embora a incorporação na matriz inorgânica do esmalte do ião fluor garanta a remineralização, existe ainda o envolvimento dos iões cálcio e fosfato (Indrapriyadharshini et al., 2018).

Como forma de aplicação tópica de produtos fluoretados, pode-se encontrar diversas formulações diferentes como, pastas dentífricas, colutórios, vernizes e/ou géis (Singh et al., 2016).

As pastas dentífricas são o método mais utilizado de aplicação tópica de flúor. Esta fórmula está indicada a sua utilização para toda a população, independentemente do risco para a doença de cárie dentária. Constitui assim uma medida de prevenção, como já mencionado. O flúor fica em concentração disponível na cavidade oral, podendo se difundir na superfície dentária. Estão disponíveis várias concentrações das pastas fluoretadas desde 250ppm de flúor até aos 5000ppm de flúor (Philip, 2019; Warreth et al., 2019; Wierichs et al., 2017).

A utilização de dentífricos com concentrações mais elevadas, como a formulação de 5000ppm é eficaz na prevenção da desmineralização, pois a presença de altas concentrações do ião fluoreto bloqueia a camada superficial do esmalte, potenciando assim a resistência à desmineralização. No entanto, concentrações mais baixas, como 1000ppm de flúor, são igualmente eficazes na remineralização das WSL (Singh et al., 2016).

Em aplicações profissionais encontramos, por exemplo, os vernizes de fluor, por norma indicados a doentes de médio e alto risco de cárie. Aquando da sua aplicação, forma uma grande acumulação de flúor na superfície dentária, podendo ser libertado de forma lenta e progressiva (Naik, Attiguppe, Malik, & Ballal, 2019; Singh et al., 2016).

O fluor é assim, ainda hoje, o *gold standart* como prevenção da doença por cárie dentária, já descrito inúmeras vezes na bibliografia como eficaz (Marinho, Chong, Worthington, & Walsh, 2016; Marinho, Worthington, Walsh, & Chong, 2015).

3.7.1.2. Caseína Fosfopeptídica – Fosfato de Cálcio Amorfo (CPP-ACP)

Com o avançar da ciência e da investigação, têm sido desenvolvidos produtos remineralizadores do esmalte que tenham biodisponibilidade de iões cálcio e fosfato, já que estes intervêm na remineralização do esmalte. O leite bovino tem uma boa biodisponibilidade deste iões, no entanto, para que existe uma saturação na cavidade oral dos iões cálcio e fosfato era necessário uma quantidade muito grande para que possa existir precipitação e remineralizar as lesões incipientes do esmalte (Buckshey, Anthonappa, King, & Itthagaran, 2019; Llana et al., 2015).

Estes sistemas baseiam-se na libertação de iões nas zonas de lesões de cárie. O CPP é formado por aminoácidos (Ser(P)-ser(P)-Glu-Glu) podendo formar um nano-complexo (CPP-ACP) da proteína do leite de fosfopeptido de caseína (CPP) com o fosfato de caseína amorfo (ACP) (Buckshey et al., 2019; Philip, 2019; Thepyou et al., 2013).

O complexo CPP-ACP é solúvel na saliva e fica intimamente ligado à placa bacteriana e à superfície do dente. Quando existe no meio uma diminuição do pH (pH ácido), condições encontradas no desenvolvimento da doença de cárie, os iões Ca^{2+} e o PO_4^{3-} são libertados, neutralizando a diminuição de pH e promovendo a remineralização e não a desmineralização, precipitando estes iões na zona da lesão de cárie (Buckshey et al., 2019; Indrapriyadharshini et al., 2018; Thepyou et al., 2013).

Como forma de aplicação podemos encontrar formulações de aplicação tópica, colutórios, *sprays* e comprimidos (Taranath, Pai, & Chakravarthy, 2014).

Pela presença da caseína, os indivíduos que sejam intolerantes a esta proteína, impossibilita a utilização deste produto, pois, já que se dissocia na saliva, pode ser deglutido e provocar efeitos indesejados (Taranath et al., 2014).

3.7.2. Resina Infiltrante ICON®

O paradigma da manutenção da doença de cárie tem mudado ao longo dos anos, desde opções terapêuticas mais tradicionais, mais invasivas, até terapêuticas mais atuais, sempre numa perspectiva cada vez menos invasivas (Doméjean, Ducamp, Léger, & Holmgren, 2015; Kannan & Padmanabhan, 2019).

Quando uma lesão de cárie não cavitada já não detém potencial remineralizador, pode-se recorrer ao uso de resinas infiltrantes fotopolimerizáveis (Kannan & Padmanabhan, 2019; Paris, Schwendicke, Keltsch, Dörfer, & Meyer-Lueckel, 2013). Esta resina infiltrante apresenta baixa viscosidade, alta penetração na lesão incipiente, uma vez que, infiltra por capilaridade e pelas microporosidades que o esmalte desmineralizado apresenta, podendo estender-se esta aplicação até às lesões no primeiro terço da dentina (D-1) (Manoharan et al., 2019; Paris et al., 2013). Após a polimerização, a resina infiltrante oclui estas microporosidades, protegendo a superfície dentária tratada dos ácidos causadores da desmineralização e que infiltrem novamente no esmalte remanescente. Em suma, esta técnica cria uma barreira dentro da lesão e não à superfície (Manoharan et al., 2019).

Uma das vantagens desta resina advém do facto de que as lesões, que se apresentam clinicamente mais esbranquiçadas. Ao existir esta perfusão da resina infiltrante nas microporosidades, o dente submetido ao tratamento irá assemelhar-se a um dente saudável, livre de lesão. (Manoharan et al., 2019; Paris et al., 2013). Isto resulta do índice refratário (IR) de esmalte (aproximadamente de 1,62) ser diferente das lesões incipientes. As microporosidades, criadas pela desmineralização, podem estar preenchidas por um meio aquoso (IR aproximadamente de 1,33) ou por ar (IR aproximadamente de 1,0). Esta diferença de IR entre o esmalte saudável e o esmalte desmineralizado traduz-se no aspeto esbranquiçado, já que a dispersão da luz é diferente. Quando as microporosidades são preenchidas pela resina (IR aproximadamente de 1,46) a cor apresentada na superfície tratada assemelha-se à da superfície saudável. Então, para além de se preencher as microporosidades, evitando a continua desmineralização, pode-se utilizar esta resina igualmente para melhorar a estética das WSL (Manoharan et al., 2019).

Existe um kit comercial para a utilização desta resina: o ICON® (DMG, Hamburg, Germany), existindo disponível para a lesões nas superfícies lisas ou nas interproximais. Os protocolos destas duas técnicas são semelhantes apenas diferenciando no caso de

tratamento das lesões interproximais, já que existe a necessidade de separação das superfícies dentárias.

Os poros das lesões à superfície têm menor volume que os mais profundos e, nestas condições, existe uma barreira formada que impede a infiltração da resina. Então, antes de iniciar o protocolo de aplicação da resina infiltrada, deve-se proceder à limpeza da superfície dentária, com o auxílio de uma escova e pasta profilática. Após esta limpeza, a superfície é tratada com ácido clorídrico (HCl) 15%, condicionamento ácido, *Icon-Etch*, 2 minutos, e em seguida, o gel é aspirado e lavado. O HCl a 15% produz uma remoção eficaz da barreira superficial e consegue penetrar mais profundamente (58 μ m) ao comparado com outros ácidos, como por exemplo, o ácido fosfórico que é capaz de penetrar a uma profundidade de 25 μ m. Quanto mais profundo for a ação do ácido melhor será a penetração da resina no corpo da lesão (Manoharan et al., 2019; Meyer-Lueckel, Paris, & Kielbassa, 2007).

Em seguida deve-se dessecar a lesão com a aplicação de etanol a 99%, *Icon Dry*, por 30 segundos, com o auxílio de jato de ar. Este passo é de extrema importância, já que garante a completa eliminação das impurezas e aumenta a eficácia da penetração a resina. (Manoharan et al., 2019).

O último passo é a aplicação da resina, *Icon Resin*, utilizando um microbrush, penetrando durante 3 minutos e em seguida fotopolimerizada. Esta resina é constituída por um composto denominado de trietilenoglicol de dimetacrilato (TEGDMA). Antes da fotopolimerização, o excesso da resina aplicada, deve ser removido com o auxílio de um rolo de algodão ou, em caso das zonas interproximais, com fio dentário. A resina deve ser aplicada duas vezes, uma vez que, pode existir uma contração de polimerização na primeira aplicação, originando espaços que podem ser ocluídos na segunda aplicação. No fim deve-se proceder ao polimento da superfície eliminando excesso igualmente (Manoharan et al., 2019).

Esta técnica de resina infiltrante pode ser aplicada para outros tipos de manchas brancas. Além da capacidade de ocluir as microporosidades causadas na desmineralização, como consegue mimetizar as propriedades óticas do esmalte, tem sido descrito a sua utilização para aumentar a estética das manchas brancas nos dentes. Estas manchas podem ter origem no desenvolvimento do esmalte, como as manchas provocadas por fluorose ou ainda nas manchas por trauma do dente decíduo (afetando o dente permanente). Já as manchas de hipomineralização não mostram resultados satisfatórios,

ficando sempre dependentes da extensão em profundidade da lesão (Gençer & Kirzioğlu, 2019).

Planeamento De Um Estudo Sobre As Características Estruturais E Biológicas Do Esmalte, Onde Foram Induzidas Lesões Artificiais De Carie Dentária

II. DESENVOLVIMENTO

1. Objetivo do Estudo

O objetivo deste projeto é o planeamento de uma futura investigação, sem a sua conceção. É desenvolvido a problemática da cárie dentária com um levantamento do estado da arte bem como da sua problemática atual. Esta futura investigação terá então como objetivo a análise sistemática do aspeto histológico do estado do esmalte humano, interpretando as características estruturais e biológicas do esmalte, onde foram induzidas lesões artificiais de carie dentária, quando:

- Comparando as características estruturais, dos grupos de estudo, entre si;
- Comparando as características estruturais, dos grupos de estudo, com o grupo controlo.

Neste caso, as lesões de cárie em esmalte são simuladas através de exposição a um ácido fraco, ácido láctico, já que é um dos produtos do metabolismo bacteriano das bactérias cariogénicas.

2. Construção do Projeto

O futuro projeto será um estudo observacional e analítico de 4 molares humanos, que serão obtidos de sujeitos anónimos através do banco de dentes da Clínica Dentária Egas Moniz. O estudo será submetido à Comissão de Ética para a Saúde da Egas Moniz, para obter esta autorização.

Os estudos observacionais fazem inferências sob o efeito de uma exposição ou intervenção em sujeitos ou amostras, nos quais a atribuição de amostras a grupos é observada e não manipulada (por exemplo, por meio de randomização) pelo investigador. A investigação observacional envolve a observação direta das amostras e, como tal, quais são expostas à intervenção é determinado por critérios de inclusão e exclusão, pelo que é preciso fazer uma pesquisa bibliográfica de forma a definir quais os padrões adequados para o estudo: os dados recolhidos da pesquisa são assim utilizados para examinar uma nova questão científica.

3. Considerações Ética

Terá de ser obtido o Consentimento Informado para a realização do futuro projeto, através da Direção Clínica da Clínica Universitária Egas Moniz, necessário para a utilização de dentes do Banco de Dentes da Clínica Dentária Egas Moniz. O estudo será submetido à Comissão Científica do Mestrado Integrado em Medicina Dentária do IUEM, assim como à Comissão de Ética para a Saúde da Egas Moniz.

Assim, deve-se proceder à aprovação da proposta de trabalho científico pela Comissão Científica e pela Comissão de Ética para a Saúde da Egas Moniz. Junto com o projeto à Comissão de ética será enviada a autorização de cedência de dentes humanos pelo Banco de Dentes Humanos da Clínica Dentária Egas Moniz.

4. Amostragem

Após a aprovação do projeto pela comissão científica, será a recolha apropriada da amostra que, neste caso, são os 4 molares humanos.

Como critérios de inclusão serão considerados: dentes hígidos, ausência de lesões de cárie, ausência de fraturas de esmalte e que não tivessem sido submetidos a tratamentos químicos ou mecânicos prévios, excetuando aqueles que estivessem contemplados na higiene dentária dos indivíduos. Assim, foram excluídos todos os dentes que apresentassem todo o tipo de irregularidades não desejadas, tais como, lesões de cárie, restaurações, fraturas, malformações, perda de integridade ou que por alguma vez tivessem sido submetidos a tratamentos mecânicos (como por exemplo ortodônticos), tratamentos químicos (como por exemplo branqueamento dentário) ou tratamentos eletromagnéticos (como por exemplo radiação laser). O substrato de tecido duro apropriado para os estudos de cárie pode ser derivado tanto de dentes humanos como de bovinos, mas o de escolha é o de dentes humanos, já que existe mais relevância clínica (Skucha-Nowak, Gibas, Tanasiewicz, Twardawa, & Szklarski, 2015).

Após a extração dentária, deve-se proceder à limpeza das superfícies das raízes dos dentes para a remoção de cálculo e restos de tecidos como o ligamento periodontal, com recurso a curetas periodontais Gracey 5/6 e em seguida um polimento usando escova profilática e/ou borracha de polimento com água e pedra pomes. Devem ser lavados com água desionizada e em seguida armazenados numa solução de Cloramina-T a 1%, durante

uma semana, e em seguida em água desionizada a 4°C, num máximo de seis meses, segundo a norma ISSO/TS 11405:2015.

5. Aleatorização das Amostras

Os espécimes em estudo foram distribuídos aleatoriamente em 3 grupos de estudo (A, B e C) e um grupo controlo (Grupo D). Cada grupo contou com uma amostra de 12 palitos, distribuídos aleatoriamente alocados pelo software Excel, utilizando a função *fx aleatoriamente*.

6. Corte das Amostras

Em seguida será a fase dos cortes dos dentes. Antes dos cortes, as faces mesiais, centrais e linguais dos dentes devem ser identificadas, por meio de uma cor, por exemplo, para a comparação das faces na análise histológica. Devem ser identificadas pelo investigador, mas sem revelar as zonas ao observador histológico, para não incorrer num viés. Em relação aos cortes, em primeiro lugar a coroa terá de ser colada com cera colante a um suporte de metacrilato. Em segundo lugar deve-se proceder aos vários cortes dos espécimes. Estes cortes são efetuados através de um micrótomo de tecidos duros disponível nas instalações da Universidade, o Accutom 50 (Struers A/S, Ballerup, Dinamarca). O primeiro corte é no sentido vestibulolingual, de forma a obter-se cortes de cerca de 1mm, seccionando-se a coroa toda. O segundo corte será no sentido mesiodistal resultando assim em fragmentos de 1x1mm, dependendo sempre da largura mesiodistal de cada dente (Figura 11). Em seguida deve ser separada a coroa da raiz, obtendo assim os fragmentos da coroa. Após os cortes deve-se proceder ao polimento das amostras através de discos de lixa de granulação 320, 600 e/ou 1200 (Buehler, Lake Bluff, IL, USA) com refrigeração na máquina polidora LaboPol-4 (Figura 12) (WS Struers 18-B, Dinamarca) a 40 rotações por minuto. Este polimento permite remover a camada mais externa do esmalte, padronizando a nossa amostra. Assim, a camada mais subsuperficial fica exposta, já que é a mais suscetível à desmineralização.

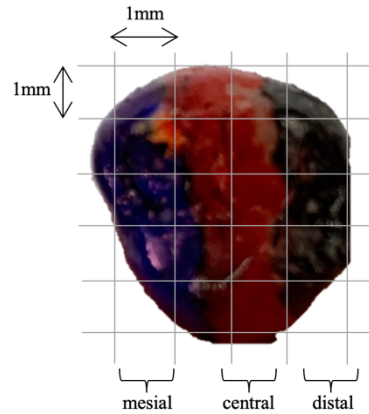


Figura 11 - Esquema representativo dos cortes a efetuar em cada dente e de um exemplo de esquema de cores



Figura 12 - Espécime resultante dos cortes efetuados

Após o corte das amostras, obtêm-se espécimes de esmalte, que serão distribuídos aleatoriamente pelos 4 grupos:

- **Grupo A (n=12) – Grupo de Estudo** – Esmalte desmineralizado + CPP-ACP
- **Grupo B (n=12) – Grupo de Estudo** – Esmalte desmineralizado + CPP-ACP + ICON®
- **Grupo C (n=12) – Grupo de Estudo** - Esmalte desmineralizado + ICON®
- **Grupo D (n=12) – Grupo Controlo** – Esmalte são + Saliva Artificial

7. Seleção de Materiais e Técnicas

7.1. Simulação das Lesões de Cárie Artificiais (*White Spots*)

A próxima fase será a simulação das lesões de cárie nos espécimes. À exceção do grupo D, todos os outros grupos são submetidos a desmineralização com ácido láctico. Os espécimes são tratados com uma solução de 50mM de ácido láctico (3mM CaCl₂.H₂O, 6μM de tetra etil metil difosfonato, 3mM KH₂PO₄ e vestígios de timol) durante 6 dias (Cardoso et al., 2016).

Durante este período de tempo, as amostras são conservadas em estufa a 37°C (Memmert INE 400, Memmert, Alemanha).

Escolhe-se o ácido láctico para criar as lesões de cárie por este ser um dos principais resultados da metabolização dos hidratos de carbonos realizado pelas principais bactérias associadas a este tipo de lesões, como por exemplo, a *Streptococcus mutans* (Y. Wang et al., 2018).

7.2. Saliva Artificial

Entre cada tratamento, os espécimes foram colocados em saliva artificial (1000 ml) constituída por: 6,84mM de NaCl (Cloreto de Sódio), 5,36mM de KCl (Cloreto de Potássio), 2,11mM de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Dihidrogeniofosfato de sódio monohidratado), 1,36mM de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (cloreto de cálcio dihidratado), 64,07 μM de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ (Sulfito de Sódio Nonahidratado), 16,65mM de Ureia (CON_2H_4), 2,89mM de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Hidrogeniofosfato de Sódio Dihidratado), água destilada ultra-pura até perfazer 1000 mL, com pH 7,0 (Urban et al., 2009).

7.3. Aplicação de CPP-ACP e ICON®

Formam-se 4 grupos de estudo, em que o Grupo D não sofre qualquer tipo de tratamento, sendo o grupo controlo. Os restantes grupos, Grupo A, B e C sofrem todos desmineralização com ácido láctico.

Em seguida, o Grupo A é remineralizado com CPP-ACP, uma vez por dia, na área afetada, sendo a amostra guardada em saliva artificial, durante 4 semanas.

O Grupo B é remineralizado com CPP-ACP, uma vez por dia, sendo armazenado mais uma vez em saliva artificial, durante 4 semanas. No fim deste tratamento, é aplicado resina infiltrante ICON®.

Por fim, o Grupo C, as amostras ficam armazenadas em saliva artificial, durante 4 semanas, e no fim deste período, aplica-se ICON®.

No final da aplicação dos produtos remineralizantes, observa-se as alterações histológicas dos Grupos 2, 3 e 4. Observa-se também o Grupo 1, uma vez que é o grupo controlo.

O CPP-ACP (GC Tooth Mousse, Recaldent™, GC Europe, é aplicado com um microbrush sobre a face de cada amostra e, após cada aplicação, coloca-se na estufa a 37°C. Após os 3 minutos de aplicação, os excessos do CPP-ACP são removidos de forma manual, com um microbrush, e o restante por diluição na saliva artificial, aquando do armazenamento das amostras.

A resina infiltrante ICON® deve ser aplicada na superfície a tratar. O modo de aplicação deve seguir as normas do fabricante. De acordo com o fabricante, deve-se seguir o seguinte protocolo:

- a) Limpeza da superfície a tratar;
- b) Seringa com *IconEtch*, que contém em ácido clorídrico, ácido silícico pirogénico e substâncias de reação ativa, durante 2 minutos;
- c) Lavagem da amostra com água abundante durante 30 segundos seguida da sua secagem ao ar;
- d) Seringa com *IconDry*, que contém etanol a 99%, durante 30 segundos;
- e) Seringa de *IconInfiltrant* durante 3 minutos, sem luz direta;
- f) Fotopolimerização durante 40 segundos;
- g) Repetição da microinfiltração com seringa *IconInfiltrant (passo e)* durante 1 minuto;
- h) Fotopolimerização durante 40 segundos

8. Análise Histológica das Amostras ao Microscópio Ótico

A microscopia eletrónica costuma ser a técnica mais utilizada para a avaliação histológica das lesões de cárie, no entanto optou-se por se fazer a análise através da microscopia ótica, visto que é uma técnica que ainda não está descrita na literatura em termos da doença de cárie, e será um método diferente de quantificar esta condição clínica.

Após os procedimentos descritos e otimização da técnica, todas as lâminas serão observadas pelo mesmo observador de acordo com o protocolo:

- a) Todas as amostras serão focadas na objetiva de menor ampliação (4x), será feita uma descrição qualitativa da área observada tomando os mesmos referenciais em todas as amostras;
- b) Observar-se-ão, sequencialmente as amostras nas objetivas de maior ampliação e serão registadas todas as alterações/diferenças entre as várias lâminas nas superfícies e/ou áreas homólogas dos vários grupos;
- c) Sempre que possível, serão quantificadas as alterações qualitativas que forem observadas nas diferentes amostras;
- d) O método de quantificação será também otimizado, mas prevê-se desenhar previamente os pontos de referência, unindo-os e obtendo uma linha de contorno

que permita, sempre que possível, medir a espessura do tecido preservado até à linha de referência.

8.1. Fixação

O primeiro passo para a preparação de lâminas histológicas passa por fixar os tecidos. Esta fixação dos tecidos deve ser realizada o mais rapidamente possível aquando da remoção do tecido (Bancroft, Suvarna, & Layton, 2018).

Esta fixação passa por impedir que as amostras sofram algum tipo de processo de destruição, seja ela desnaturação, autólise ou até mesmo putrefação. Ou seja, ao se fixar as amostras permite-se que estejam o mais próximas do seu estado *in vivo*, sendo vantajoso para mimetizar as condições encontradas daquele tecido, para uma melhor análise microscópica (Bancroft et al., 2018).

O fixador mais usado na microscopia ótica é o formaldeído, no entanto não existe um fixador ideal, já que apresentam sempre vantagens e desvantagens. Deve-se adaptar o fixador às amostras que se pretende analisar. O formaldeído é um gás, que em solução atinge uma concentração máxima de formaldeído de 40%, denominando-se de formol. Geralmente utiliza-se, então, formol a 10%, correspondendo a uma solução de formaldeído a 4%. O seu mecanismo de ação passa por fixar e estabilizar o tecido, formando pontes de grupos metileno, que originam ligações na amostra (Bancroft et al., 2018).

Neste estudo, após o tratamento das amostras, colocar-se-ão os espécimes em formol a 10%, num período de 24h. Caso seja necessário maior tempo de armazenamento, deve-se deixar os espécimes até 48h em formol e em seguida em etanol a 70%. O etanol a 70% permite armazenar a amostra e não altera os resultados histoquímicos (Bancroft et al., 2018).

8.2. Desidratação

Após a fixação, deve-se seguir a desidratação da amostra. Neste procedimento não iremos proceder à etapa da descalcificação, uma vez que, como os nossos espécimes são maioritariamente constituídos de tecido mineral, e estando a estudar os efeitos da doença de cárie após tratamento remineralizador, uma etapa desmineralizadora impediria retirar conclusões deste estudo.

Nesta etapa realiza-se a desidratação dos espécimes através do etanol, em concentrações progressivas, seguindo o protocolo:

- Álcool a 70%, *overnight*, em vácuo;
- Álcool a 95%, durante o dia, em vácuo;
- Álcool a 100%, *overnight*, em vácuo;
- Acetona, durante o dia, em vácuo;

O uso destes reagentes prendem-se pelo facto de ser necessário remover a água que as amostras contêm. À posteriori, o espaço que a água ocupava, será ocupado pelo infiltrante (Bancroft et al., 2018; Feldman & Wolfe, 2014).

8.3. Infiltração

A Infiltração das amostras será com uma solução de metacrilato. Segundo Bancroft et al. (2018), esta deve ser com uma solução de Metil-metacrilato (15ml), Dibutil-ftalato (5ml) e peróxido de benzoílo (1g). Esta solução deve impregnar as amostras no espaço onde houve desidratação, ou seja, ocupa o espaço que a água estava a ocupar.

8.4. Polimerização

Após incorporação da solução infiltrante deve-se seguir para a polimerização da solução infiltrante, contento o nosso espécime a analisar.

Para isso, deve-se adicionar à solução infiltradora 125µL de *N,N*-dimetilanilina para cada 10mL de solução infiltradora. Esta reação é uma reação exotérmica e que deve ser realizada num recipiente com tampa, para que a humidade do ar não interfira na polimerização (Bancroft et al., 2018).

8.5. Corte das Amostras

Após a polimerização das amostras, estas ficam na forma do recipiente onde ocorreu a polimerização.

O corte das amostras será realizado no micrótomo (MINOT, Microm, HM355S, Adaptado a corte de resinas, Japan), com uma lâmina de tungstênio com cortes com cerca de 8-10µm.

8.6. Observação Microscopia Ótica

Após todos os passos para preparação das amostras e o respetivo corte, as amostras serão observadas na lupa esteromicroscópica Leica™ MZ6 (Leica, Germany) com uma câmara Leica™ DFC (20X), aplicando o software Leica Application Suite versão 3.5.0, utilizando o Critério ICDAS II.

A avaliação da desmineralização deverá ser feita através da comparação com os grupos de controlo, verificando a existência ou não de diferenças nos tecidos que sofreram desmineralização ou não. Assim, em todas as amostras será identificado áreas de referência, e medir-se-á a espessura do tecido até à superfície, comparando posteriormente com o grupo controlo. Desta forma, nos diferentes grupos, será possível quantificar a perda de mineral e, portanto, o efeito de cada produto remineralizante, no caso do CPP-ACP e da resina infiltrante, no caso do ICON®.

9. Protocolo Experimental

Grupo A (n=12) – Grupo de Estudo

- 1) Amostras imersas em Saliva Artificial
- 2) Aplicar topicamente durante 3 min CPP-ACP, com um microbrush, durante 4 semanas, 1 vezes por dia.
- 3) Entre cada ciclo e após, os fragmentos devem ficar imerso em Saliva Artificial, mudada em cada aplicação, armazenados a 37°C.
- 4) Observação e Análise em Microscopia Ótica.

Grupo B (n=12) – Grupo de Estudo

- 1) Amostras imersas em Saliva Artificial, durante 4 semanas;
- 2) Aplicar topicamente durante 3 min CPP-ACP, com um microbrush, durante 4 semanas, 1 vezes por dia;
- 3) Entre cada ciclo e após, os fragmentos devem ficar imerso em Saliva Artificial, mudada em cada aplicação, armazenados a 37°C;
- 4) No final do ciclo de 4 semanas, aplicação do ICON® (Resina Infiltrativa);
- 5) Observação e Análise em Microscopia Ótica;

Grupo C (n=12) – Grupo de Estudo

- 1) Amostras imersas em Saliva Artificial, durante 4 semanas, armazenados a 37°C.
- 2) Após as 4 semanas, aplicação do Icon® (Resina Infiltrativa), com o protocolo anteriormente explicado.
- 3) Observação e Análise em Microscopia Ótica.

Grupo D (n=12) – Grupo Controlo – Esmalte são + Saliva Artificial

- 1) Amostras imersas em Saliva Artificial, durante 4 semanas.
- 2) Observação e Análise em Microscopia Ótica.

10. Fluxograma do Trabalho Experimental

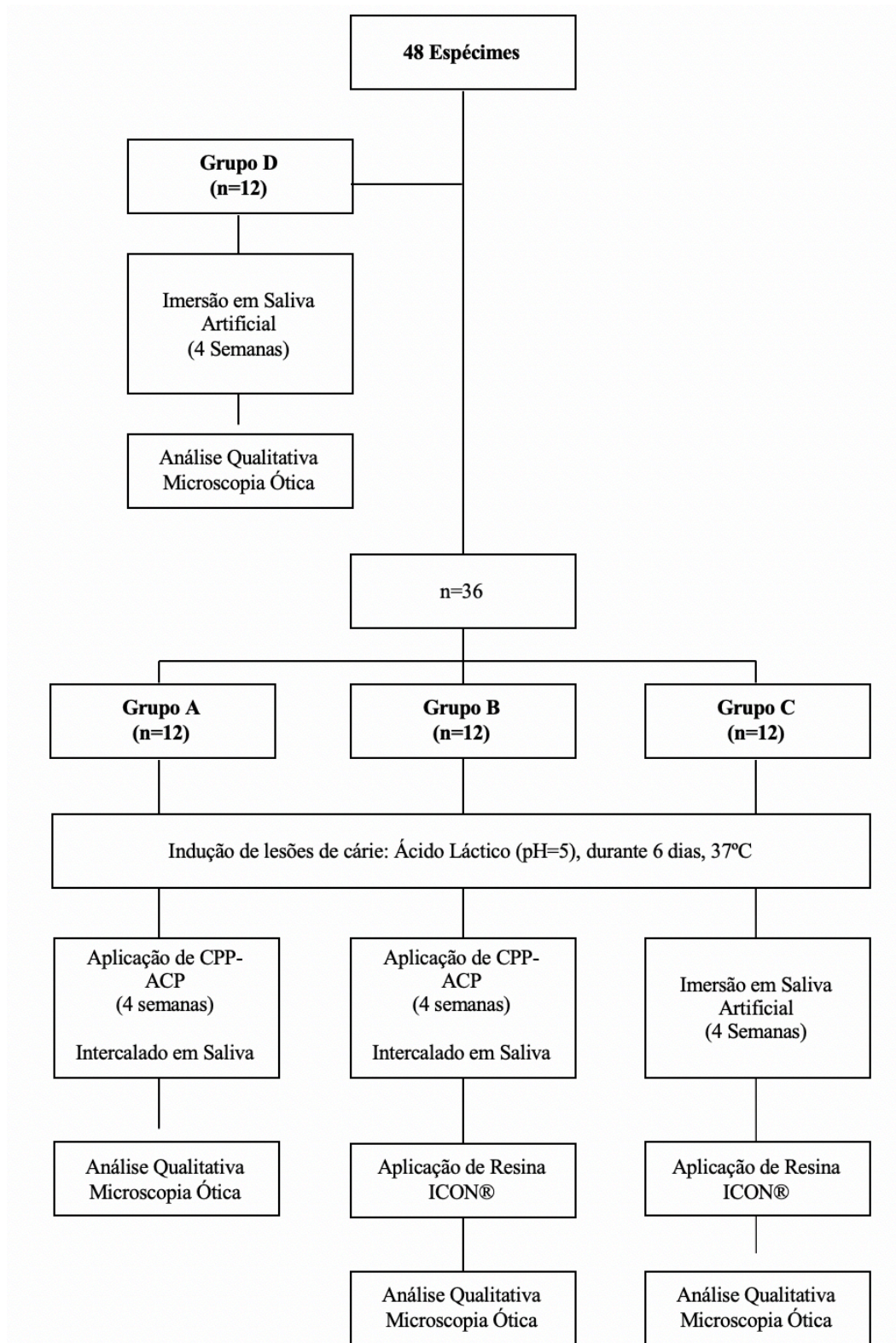


Figura 13 - Fluxograma do Trabalho Experimental

Planeamento De Um Estudo Sobre As Características Estruturais E Biológicas Do Esmalte, Onde Foram Induzidas Lesões Artificiais De Carie Dentária

III. CONCLUSÃO

A cárie dentária é uma doença crónica que afeta grande parte da população mundial, e cada vez mais apresenta vários desafios, que nos tratamentos e técnicas aplicadas, quer em compreender como reverter os seus efeitos na cavidade oral o mais cedo possível. Como a cárie dentária apresenta muitos desafios para a sua erradicação, compreender melhor a sua etiologia e formas de tratamento, requerem estudos variados, com desenhos diferentes e com objetivos diferentes.

O planeamento deste estudo tem como principal objetivo verificar se novas metodologias respondem a alguns desafios que estudos sobre a cárie dentário vêm apresentando. Tipicamente, os estudos que apresentam esta metodologia analisam as suas amostras em microscopia eletrónica. No entanto, este planeamento visa uma análise histológica em microscopia ótica, podendo ser um complemento aos critérios já definidos para a classificação da doença de cárie.

Este estudo visa também diferentes abordagens quando existe uma desmineralização do esmalte dentário, podendo recorrer-se a produtos que induzam a remineralização ou que preencham os espaços da matriz desmineralizada. Estes produtos, pelas diferentes características que apresentam e pelo seu método de aplicação, estão estudados que conseguem proteger a matriz de esmalte de novos ciclos desmineralizadores.

Este trabalho visa, então, facilitar uma futura investigação sobre este tema, visto que aborda os principais problemas dos clínicos na atualidade das lesões de cárie. Este planeamento espalma exatamente que protocolo se deve seguir e que metodologia se deve centrar uma futura investigação que daqui possa resultar.

Planeamento De Um Estudo Sobre As Características Estruturais E Biológicas Do Esmalte, Onde Foram Induzidas Lesões Artificiais De Carie Dentária

IV. BIBLIOGRAFIA

- Abdullah, Z., & John, J. (2016). Minimally Invasive Treatment of White Spot Lesions-- A Systematic Review. *Oral Health & Preventive Dentistry*, *14*(3), 197–205. <https://doi.org/10.3290/j.ohpd.a35745>
- Albano, M. G., D'Ivernois, J. F., de Andrade, V., & Levy, G. (2019). Patient education in dental medicine: A review of the literature. *European Journal of Dental Education : Official Journal of the Association for Dental Education in Europe*, *23*(2), 110–118. <https://doi.org/10.1111/eje.12409>
- Arifa, M. K., Ephraim, R., & Rajamani, T. (2019). Recent Advances in Dental Hard Tissue Remineralization: A Review of Literature. *International Journal of Clinical Pediatric Dentistry*, *12*(2), 139–144. <https://doi.org/10.5005/jp-journals-10005-1603>
- Arrieta, Z. L., Fogalli, G. B., & Line, S. R. P. (2018). Digital enhancement of dental enamel microstructure images from intact teeth. *Microscopy Research and Technique*, *81*(9), 1036–1041. <https://doi.org/10.1002/jemt.23070>
- Aykut-Yetkiner, A., Wiegand, A., & Attin, T. (2014). The effect of saliva substitutes on enamel erosion in vitro. *Journal of Dentistry*, *42*(6), 720–725. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2014.03.012>
- Bagramian, R. A., Garcia-Godoy, F., & Volpe, A. R. (2009). The global increase in dental caries. A pending public health crisis. *American Journal of Dentistry*, *22*(1), 3–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19281105>
- Bancroft, J. D., Suvarna, S. K., & Layton, C. (2018). *Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques - Immunohistochemical and immunofluorescent techniques*. *Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques* (8th ed.). <https://doi.org/10.1016/C20150001435>
- Bardow, A., Moe, D., Nyvad, B., & Nauntofte, B. (2000). The buffer capacity and buffer systems of human whole saliva measured without loss of CO₂. *Archives of Oral Biology*, *45*(1), 1–12. [https://doi.org/10.1016/S0003-9969\(99\)00119-3](https://doi.org/10.1016/S0003-9969(99)00119-3)
- Batista, G. R., Torres, C. R. G., Sener, B., Attin, T., & Wiegand, A. (2016). Artificial Saliva Formulations versus Human Saliva Pretreatment in Dental Erosion Experiments. *Caries Research*, *50*(1), 78–86. <https://doi.org/10.1159/000443188>

- Ben-nissan, B. (2014). *Advances in Calcium Phosphate Biomaterials*. (B. Ben-Nissan, Ed.), *Livro* (Vol. 2). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
<https://doi.org/10.1007/978-3-642-53980-0>
- Bishara, S. E., & Ostby, A. W. (2008). White Spot Lesions: Formation, Prevention, and Treatment. *Seminars in Orthodontics*, *14*(3), 174–182.
<https://doi.org/10.1053/j.sodo.2008.03.002>
- Buckshey, S., Anthonappa, R. P., King, N. M., & Itthagarun, A. (2019). Remineralizing Potential of Clinpro® and Tooth Mousse Plus® on Artificial Carious Lesions. *The Journal of Clinical Pediatric Dentistry*, *43*(2), 103–108.
<https://doi.org/10.17796/1053-4625-43.2.6>
- Buzalaf, M. A. R., Hannas, A. R., & Kato, M. T. (2012). Saliva and dental erosion. *Journal of Applied Oral Science*, *20*(5), 493–502. <https://doi.org/10.1590/S1678-77572012000500001>
- Calado, R., Ferreira, C. S., Nogueira, P., & Melo, P. (2017). Caries prevalence and treatment needs in young people in Portugal: The third national study. *Community Dental Health*, *34*(2), 107–111. https://doi.org/10.1922/CDH_4016Calado05
- Cardoso, C. A. B., Cassiano, L. P. S., Costa, E. N., Souza-E-Silva, C. M., Magalhães, A. C., Grizzo, L. T., ... Buzalaf, M. A. R. (2016). Effect of xylitol varnishes on remineralization of artificial enamel caries lesions in situ. *Journal of Dentistry*, *50*, 74–78. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2016.03.011>
- Carpenter, G. H. (2013). The Secretion, Components, and Properties of Saliva. *Annual Review of Food Science and Technology*, *4*(1), 267–276.
<https://doi.org/10.1146/annurev-food-030212-182700>
- Dawes, C. (2008, May). Salivary flow patterns and the health of hard and soft oral tissues. *Journal of the American Dental Association*. © 2008 American Dental Association. <https://doi.org/10.14219/jada.archive.2008.0351>
- Doméjean, S., Ducamp, R., Léger, S., & Holmgren, C. (2015). Resin Infiltration of Non-Cavitated Caries Lesions: A Systematic Review. *Medical Principles and Practice*, *24*(3), 216–221. <https://doi.org/10.1159/000371709>
- Eliasson, L., & Carlén, A. (2010). An update on minor salivary gland secretions. *European Journal of Oral Sciences*, *118*(5), 435–442.

- <https://doi.org/10.1111/j.1600-0722.2010.00766.x>
- Farooq, I., Moheet, I. A., Imran, Z., & Farooq, U. (2013). A review of novel dental caries preventive material: Casein phosphopeptide–amorphous calcium phosphate (CPP–ACP) complex. *King Saud University Journal of Dental Sciences*, 4(2), 47–51. <https://doi.org/10.1016/j.ksujds.2013.03.004>
- Featherstone, J. (2008). Dental caries: a dynamic disease process. *Australian Dental Journal*, 53(3), 286–291. <https://doi.org/10.1111/j.1834-7819.2008.00064.x>
- Featherstone, J. D. B. (2000). The Science and Practice of Caries Prevention. *The Journal of the American Dental Association*, 131(7), 887–899. <https://doi.org/10.14219/jada.archive.2000.0307>
- Feldman, A. T., & Wolfe, D. (2014). Tissue processing and hematoxylin and eosin staining. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1180, 31–43. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1050-2_3
- Fernández-Barrera, M. Á., Lara-Carrillo, E., Scougall-Vilchis, R. J., Pontigo-Loyola, A. P., Ávila-Burgos, L., Casanova-Rosado, J. F., ... Medina-Solís, C. E. (2019). Study protocol of the cost-effectiveness comparison of two preventive methods in the incidence of caries. *Medicine*, 98(30), e16634. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000016634>
- García-Godoy, F., & Hicks, M. J. (2008). Maintaining the integrity of the enamel surface. *The Journal of the American Dental Association*, 139, 25S-34S. <https://doi.org/10.14219/jada.archive.2008.0352>
- Garrido, M. A., Giráldez, I., Ceballos, L., Río, M. T. G. del, & Rodríguez, J. (2011). Nanotribological behaviour of tooth enamel rod affected by bleaching treatment. *Wear*, 271(9–10), 2334–2339. <https://doi.org/10.1016/j.wear.2011.01.059>
- Gençer, M. D. G., & Kirzioğlu, Z. (2019). A comparison of the effectiveness of resin infiltration and microabrasion treatments applied to developmental enamel defects in color masking. *Dental Materials Journal*, 38(2), 295–302. <https://doi.org/10.4012/dmj.2018-074>
- Guerrieri, A., Gaucher, C., Bonte, E., & Lasfargues, J. J. (2012). Minimal intervention dentistry: part 4. Detection and diagnosis of initial caries lesions. *British Dental Journal*, 213(11), 551–557. <https://doi.org/10.1038/sj.bdj.2012.1087>

- Humphrey, S. P., & Williamson, R. T. (2001). A review of saliva: normal composition, flow, and function. *The Journal of Prosthetic Dentistry*, *85*(2), 162–169. <https://doi.org/10.1067/mpr.2001.113778>
- Indrapriyadharshini, K., Madan Kumar, P. D., Sharma, K., & Iyer, K. (2018). Remineralizing potential of CPP-ACP in white spot lesions - A systematic review. *Indian Journal of Dental Research : Official Publication of Indian Society for Dental Research*, *29*(4), 487–496. https://doi.org/10.4103/ijdr.IJDR_364_17
- Ionta, F. Q., Mendonça, F. L., De Oliveira, G. C., De Alencar, C. R. B., Honório, H. M., Magalhães, A. C., & Rios, D. (2014). In vitro assessment of artificial saliva formulations on initial enamel erosion remineralization. *Journal of Dentistry*, *42*(2), 175–179. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2013.11.009>
- Ismail, A. I., Sohn, W., Tellez, M., Amaya, A., Sen, A., Hasson, H., & Pitts, N. B. (2007). The International Caries Detection and Assessment System (ICDAS): an integrated system for measuring dental caries. *Community Dentistry and Oral Epidemiology*, *35*(3), 170–178. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0528.2007.00347.x>
- J Pytko-Polonczyk, J., Jakubik, A., Przeklasa-Bierowiec, A., & Muszynska, B. (2017). Artificial saliva and its use in biological experiments. *Journal of Physiology and Pharmacology : An Official Journal of the Polish Physiological Society*, *68*(6), 807–813. <https://doi.org/10.1111/j.1467-8497.1968.tb00717.x>
- Kannan, A., & Padmanabhan, S. (2019). Comparative evaluation of Icon® resin infiltration and Clinpro™ XT varnish on colour and fluorescence changes of white spot lesions: a randomized controlled trial. *Progress in Orthodontics*, *20*(1), 23. <https://doi.org/10.1186/s40510-019-0276-y>
- Lacruz, R. S., Habelitz, S., Wright, J. T., & Paine, M. L. (2017). Dental Enamel Formation and Implications for Oral Health and Disease. *Physiological Reviews*, *97*(3), 939–993. <https://doi.org/10.1152/physrev.00030.2016>
- Li, X., Wang, J., Joiner, A., & Chang, J. (2014). The remineralisation of enamel: a review of the literature. *Journal of Dentistry*, *42*, S12–S20. [https://doi.org/10.1016/S0300-5712\(14\)50003-6](https://doi.org/10.1016/S0300-5712(14)50003-6)
- Llena, C., Leyda, A. M., & Forner, L. (2015). CPP-ACP and CPP-ACFP versus fluoride varnish in remineralisation of early caries lesions. A prospective study. *European Journal of Paediatric Dentistry*, *16*(3), 181–186. Retrieved from

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26418918>
- Lussi, A., Schlueter, N., Rakhmatullina, E., & Ganss, C. (2011). Dental Erosion – An Overview with Emphasis on Chemical and Histopathological Aspects. *Caries Research*, 45(s1), 2–12. <https://doi.org/10.1159/000325915>
- Lussi, Adrian, & Carvalho, T. S. (2015). The future of fluorides and other protective agents in erosion prevention. *Caries Research*, 49(suppl 1), 18–29. <https://doi.org/10.1159/000380886>
- Lynch, C. D., O’sullivan, V. R., Dockery, P., McGillicuddy, C. T., Rees, J. S., & Sloan, A. J. (2011). Hunter-Schreger Band patterns and their implications for clinical dentistry. *Journal of Oral Rehabilitation*, 38(5), 359–365. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2842.2010.02162.x>
- Manoharan, V., Arun Kumar, S., Arumugam, S. B., Anand, V., Krishnamoorthy, S., & Methippara, J. J. (2019). Is Resin Infiltration a Microinvasive Approach to White Lesions of Calcified Tooth Structures?: A Systemic Review. *International Journal of Clinical Pediatric Dentistry*, 12(1), 53–58. <https://doi.org/10.5005/jp-journals-10005-1579>
- Marinho, V. C., Chong, L. Y., Worthington, H. V., & Walsh, T. (2016). Fluoride mouthrinses for preventing dental caries in children and adolescents. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 7(7), CD002284. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD002284.pub2>
- Marinho, V. C., Worthington, H. V., Walsh, T., & Chong, L. Y. (2015). Fluoride gels for preventing dental caries in children and adolescents. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, (6), CD002280. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD002280.pub2>
- Marsh, P. D., Do, T., Beighton, D., & Devine, D. A. (2016). Influence of saliva on the oral microbiota. *Periodontology 2000*, 70(1), 80–92. <https://doi.org/10.1111/prd.12098>
- Maruyama, C. L., Monroe, M. M., Hunt, J. P., Buchmann, L., & Baker, O. J. (2019, March). Comparing human and mouse salivary glands: A practice guide for salivary researchers. *Oral Diseases*. <https://doi.org/10.1111/odi.12840>
- Maske, T. T., van de Sande, F. H., Arthur, R. A., Huysmans, M. C. D. N. J. M., &

- Cenci, M. S. (2017). In vitro biofilm models to study dental caries: a systematic review. *Biofouling*, 33(8), 661–675.
<https://doi.org/10.1080/08927014.2017.1354248>
- Mazumder, P., Prajapati, S., Bapat, R., & Moradian-Oldak, J. (2016). Amelogenin-Ameloblastin Spatial Interaction around Maturing Enamel Rods. *Journal of Dental Research*, 95(9), 1042–1048. <https://doi.org/10.1177/0022034516645389>
- Meyer-Lueckel, H., & Paris, S. (2016). When and How to Intervene in the Caries Process. *Operative Dentistry*, 41(S7), S35–S47. <https://doi.org/10.2341/15-022-O>
- Meyer-Lueckel, H., Paris, S., & Kielbassa, A. M. (2007). Surface layer erosion of natural caries lesions with phosphoric and hydrochloric acid gels in preparation for resin infiltration. *Caries Research*, 41(3), 223–230.
<https://doi.org/10.1159/000099323>
- Mohammed, N. R., Lynch, R. J. M., & Anderson, P. (2014). Effects of fluoride concentration on enamel demineralization kinetics in vitro. *Journal of Dentistry*, 42(5), 613–618. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2013.12.005>
- Molnar, S, & Gantt, D. G. (1977). Functional implications of primate enamel thickness. *American Journal of Physical Anthropology*, 46(3), 447–454.
<https://doi.org/10.1002/ajpa.1330460310>
- Molnar, Stephen, & Gantt, D. G. (1977). Functional implications of primate enamel thickness. *American Journal of Physical Anthropology*, 46(3), 447–454.
<https://doi.org/10.1002/ajpa.1330460310>
- Mothey, D., Buttaro, B. A., & Piggot, P. J. (2014). Mucin can enhance growth, biofilm formation, and survival of *Streptococcus mutans*. *FEMS Microbiology Letters*, 350(2), 161–167. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12336>
- Naik, S. V, Attiguppe, P., Malik, N., & Ballal, S. (2019). CPP–ACP and Fluoride: A Synergism to Combat Caries. *International Journal of Clinical Pediatric Dentistry*, 12(2), 120–125. <https://doi.org/10.5005/jp-journals-10005-1608>
- Niu, L., Zhang, W., Pashley, D. H., Breschi, L., Mao, J., Chen, J., & Tay, F. R. (2014). Biomimetic remineralization of dentin. *Dental Materials*, 30(1), 77–96.
<https://doi.org/10.1016/j.dental.2013.07.013>
- Ortiz-Ruiz, A. J., Teruel-Fernández, J. de D., Alcolea-Rubio, L. A., Hernández-

- Fernández, A., Martínez-Beneyto, Y., & Gispert-Guirado, F. (2018). Structural differences in enamel and dentin in human, bovine, porcine, and ovine teeth. *Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger*, 218, 7–17.
<https://doi.org/10.1016/j.aanat.2017.12.012>
- Paris, S., Schwendicke, F., Keltsch, J., Dörfer, C., & Meyer-Lueckel, H. (2013). Masking of white spot lesions by resin infiltration in vitro. *Journal of Dentistry*, 41 Suppl 5(SUPPL.5), e28-34. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2013.04.003>
- Pateel, D. G. S., Gunjal, S., Math, S. Y., Murugesappa, D. G., & Nair, S. M. (2017). Correlation of Salivary Statherin and Calcium Levels with Dental Calculus Formation: A Preliminary Study. *International Journal of Dentistry*, 2017, 2857629. <https://doi.org/10.1155/2017/2857629>
- Pathak, S., Roopa, K., Poornima, P., & Neena, I. (2015). White spot lesions: A literature review. *Journal of Pediatric Dentistry*, 3(1), 1. <https://doi.org/10.4103/2321-6646.151839>
- Pedersen, A. M. L., Sørensen, C. E., Proctor, G. B., Carpenter, G. H., & Ekström, J. (2018). Salivary secretion in health and disease. *Journal of Oral Rehabilitation*, 45(9), 730–746. <https://doi.org/10.1111/joor.12664>
- Peres, M. A., Macpherson, L. M. D., Weyant, R. J., Daly, B., Venturelli, R., Mathur, M. R., ... Watt, R. G. (2019). Oral diseases: a global public health challenge. *The Lancet*, 394(10194), 249–260. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)31146-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)31146-8)
- Philip, N. (2019). State of the Art Enamel Remineralization Systems: The Next Frontier in Caries Management. *Caries Research*, 53(3), 284–295.
<https://doi.org/10.1159/000493031>
- Pitts, N., Melo, P., Martignon, S., Ekstrand, K., & Ismail, A. (2011). Caries risk assessment, diagnosis and synthesis in the context of a European Core Curriculum in Cariology. *European Journal of Dental Education*, 15(SUPPL.1), 23–31.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-0579.2011.00711.x>
- Pitts, N.B. (2004). Are We Ready to Move from Operative to Non-Operative/Preventive Treatment of Dental Caries in Clinical Practice? *Caries Research*, 38(3), 294–304.
<https://doi.org/10.1159/000077769>
- Pitts, Nigel B, Zero, D. T., Marsh, P. D., Ekstrand, K., Weintraub, J. A., Ramos-Gomez,

- F., ... Ismail, A. (2017). Dental Caries. *Nature Reviews Disease Primers*, 3(1), 17030. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.30>
- Proctor, G. B. (2016). The physiology of salivary secretion. *Periodontology 2000*, 70(1), 11–25. <https://doi.org/10.1111/prd.12116>
- Ranjbar O, B. (2018). Efficacy of Casein Phosphopeptide Amorphous Calcium Phosphate with and without Fluoride in Comparison with Fluoride Gel for Enamel Remineralization. *Open Access Journal of Dental Sciences*, 3(6). <https://doi.org/10.23880/OAJDS-16000187>
- Selwitz, R. H., Ismail, A. I., & Pitts, N. B. (2007). Dental caries. *The Lancet*, 369(9555), 51–59. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)60031-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)60031-2)
- Silva, I. J. de O., Almeida, A. R. P., Falcão, N. C., Freitas Junior, A. C., Bento, P. M., & Queiroz, J. R. C. (2016). HIPOSSALIVAÇÃO: ETIOLOGIA, DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO. *Revista Bahiana de Odontologia*, 7(2). <https://doi.org/10.17267/2238-2720revbahianaodonto.v7i2.856>
- Singh, S., Singh, S. P., Goyal, A., Utreja, A. K., & Jena, A. K. (2016). Effects of various remineralizing agents on the outcome of post-orthodontic white spot lesions (WSLs): a clinical trial. *Progress in Orthodontics*, 17(1), 25. <https://doi.org/10.1186/s40510-016-0138-9>
- Skucha-Nowak, M., Gibas, M., Tanasiewicz, M., Twardawa, H., & Szklarski, T. (2015). Natural and Controlled Demineralization for Study Purposes in Minimally Invasive Dentistry. *Advances in Clinical and Experimental Medicine : Official Organ Wroclaw Medical University*, 24(5), 891–898. <https://doi.org/10.17219/acem/28903>
- Souza, J. B., Rodrigues, P. C. F., Lopes, L. G., Guilherme, A. S., Freitas, G. C., & Moreira, F. do C. L. (2010). Hipoplasia do Esmalte: Tratamento restaurador estético. *Revista Odontológica Do Brasil Central*, 18(47), 14–19.
- Tao, S., Zhu, Y., Yuan, H., Tao, S., Cheng, Y., Li, J., & He, L. (2018). Efficacy of fluorides and CPP-ACP vs fluorides monotherapy on early caries lesions: A systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE*, 13(4), 4–7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196660>
- Taranath, A., Pai, D., & Chakravarthy, K. (2014). The role of casein phosphopeptide-

- amorphous calcium phosphate products in remineralization of incipient enamel lesions and its substantivity. *Journal of Experimental and Integrative Medicine*, 4(1), 67. <https://doi.org/10.5455/jeim.261113.br.018>
- Teruel, J. de D., Alcolea, A., Hernández, A., & Ruiz, A. J. O. (2015). Comparison of chemical composition of enamel and dentine in human, bovine, porcine and ovine teeth. *Archives of Oral Biology*, 60(5), 768–775. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2015.01.014>
- Thepyou, R., Chanmitkul, W., Thanatvarakorn, O., Hamba, H., Chob-Isara, W., Trairatvorakul, C., & Tagami, J. (2013). Casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate and glass ionomer show distinct effects in the remineralization of proximal artificial caries lesion in situ. *Dental Materials Journal*, 32(4), 648–653. <https://doi.org/10.4012/dmj.2012-253>
- Thompson, V. P. (2019). The tooth: An analogue for biomimetic materials design and processing. *Dental Materials*, 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2019.08.106>
- Torres, C. R. G., Borges, A. B., Torres, L. M. S., Gomes, I. S., & De Oliveira, R. S. (2011). Effect of caries infiltration technique and fluoride therapy on the colour masking of white spot lesions. *Journal of Dentistry*, 39(3), 202–207. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2010.12.004>
- Urban, V. M., Machado, A. L., Vergani, C. E., Giampaolo, E. T., Pavarina, A. C., de Almeida, F. G., & Cass, Q. B. (2009). Effect of water-bath post-polymerization on the mechanical properties, degree of conversion, and leaching of residual compounds of hard chairside reline resins. *Dental Materials*, 25(5), 662–671. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2008.10.017>
- van't Hof, W., Veerman, E. C. I., Nieuw Amerongen, A. V., & Ligtenberg, A. J. M. (2014). Antimicrobial Defense Systems in Saliva. In *Monographs in Oral Science* (Vol. 24, pp. 40–51). <https://doi.org/10.1159/000358783>
- Wang, X., Mihailova, B., Klocke, A., Heidrich, S., & Bismayer, U. (2011). Effect of Artificial Saliva on the Apatite Structure of Eroded Enamel. *International Journal of Spectroscopy*, 2011, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2011/236496>
- Wang, Y., Wang, X., Jiang, W., Wang, K., Luo, J., Li, W., ... Zhang, L. (2018). Antimicrobial peptide GH12 suppresses cariogenic virulence factors of

- Streptococcus mutans. *Journal of Oral Microbiology*, 10(1), 1442089.
<https://doi.org/10.1080/20002297.2018.1442089>
- Warreth, A., Abuhijleh, E., Almaghribi, M. A., Mahwal, G., & Ashawish, A. (2019). Tooth surface loss: A review of literature. *The Saudi Dental Journal*.
<https://doi.org/10.1016/j.sdentj.2019.09.004>
- West, N. X., & Joiner, A. (2014). Enamel mineral loss. *Journal of Dentistry*, 42, S2–S11. [https://doi.org/10.1016/S0300-5712\(14\)50002-4](https://doi.org/10.1016/S0300-5712(14)50002-4)
- Wierichs, R. J., Zelck, H., Doerfer, C. E., Appel, P., Paris, S., Esteves-Oliveira, M., & Meyer-Lueckel, H. (2017). Effects of dentifrices differing in fluoride compounds on artificial enamel caries lesions in vitro. *Odontology*, 105(1), 36–45.
<https://doi.org/10.1007/s10266-016-0233-x>
- Yadav, K., & Prakash, S. (2016). Caries. *Asian Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences*, (January), 73–80.
<https://doi.org/10.15272/ajbps.v6i53.773>
- Young, D. A., Nový, B. B., Zeller, G. G., Hale, R., Hart, T. C., Truelove, E. L., ... Tran, C. (2015). The american dental association caries classification system for clinical practice: A report of the american dental association council on scientific affairs. *Journal of the American Dental Association*, 146(2), 79–86.
<https://doi.org/10.1016/j.adaj.2014.11.018>
- Zabokova Bilbilova, E., Sotirovska Ivkowska, A., Georgiev, Z., & Stefanovska, E. (2013). Evaluation of buffer capacity of saliva in caries-free and caries-active children. *Prilozi (Makedonska Akademija Na Naukite i Umetnostite. Oddelenie Za Medicinski Nauki)*, 34(2), 151–157. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24280889>
- Zamorano Pino, X., Valenzuela Aránguiz, V., Vial Prado, C., & Vidal Tardón, M. (2015). Microdureza de caries incipientes artificiales infiltradas con resinas de baja viscosidad antes y después del termociclado. *Avances En Odontoestomatología*, 31(6), 371–378. <https://doi.org/10.4321/S0213-12852015000600005>