



INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

**ESTUDO SOBRE AS CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS E
BIOLÓGICAS DO ESMALTE, ONDE FORAM INDUZIDAS
LESÕES ARTIFICIAIS DE CÁRIE DENTÁRIA**

Trabalho submetido por
Maria Valdez Rebelo Rodrigues
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

outubro de 2021



INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

**ESTUDO SOBRE AS CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS E
BIOLÓGICAS DO ESMALTE, ONDE FORAM INDUZIDAS
LESÕES ARTIFICIAIS DE CÁRIE DENTÁRIA**

Trabalho submetido por
Maria Valdez Rebelo Rodrigues
para a obtenção do grau de **Mestre** em Medicina Dentária

Trabalho orientado por
Prof. Doutora Ana Cristina Manso

e coorientado por
Prof. Doutora Maria Alzira Cavacas

outubro de 2021

DEDICATÓRIA

À minha Avó Bela, esta, vai por ti, estejas onde estiveres!

AGRADECIMENTOS

Inicialmente, gostaria de agradecer à minha orientadora, a Prof. Doutora Ana Cristina Manso por ter aceite orientar-me e sobretudo por todos os valores transmitidos, pelo apoio, respeito, motivação e rigor ao longo desta investigação. O meu sincero obrigada.

À minha coorientadora, a Prof. Doutora Maria Alzira Cavacas, pela ajuda, simpatia, apoio constante e por todo o rigor que me transmitiu. Obrigada por sempre acreditar que era possível!

A ambas, o meu muito obrigada por embarcarem nesta “aventura” ao longo de mais um ano atípico, e por nunca me deixarem desistir.

Ao Prof. Doutor Mário Polido pela gentileza em permitir que o trabalho de investigação fosse realizado no Laboratório de Biomateriais.

A todos os técnicos de laboratório que me auxiliaram ao longo desta jornada, à Sandra, ao Gonçalo, à Natacha, obrigada pelas palavras de motivação e por todo o empenho. Um especial agradecimento ao Pedro Henriques, pela sua preciosa ajuda, por sempre me acalmar nas horas mais difíceis e por me ajudar a concretizar este trabalho.

À Cooperativa de Ensino Superior Egas Moniz, por ter sido a minha casa ao longo destes 5 anos, por me ter proporcionado alguns dos melhores momentos da minha vida, pelo ensino de excelência e pelo rigor sempre transmitidos. A todos os professores, funcionários e colegas que tornam a Egas num ambiente único e inesquecível, obrigada!

Aos meus colegas de box, Maria, Nadine e Francisco, obrigada por sempre acreditarem em mim, por me apoiarem incondicionalmente e por fazerem desta caminhada, a mais bonita de todas, sem vocês, de certeza que não era a mesma coisa.

Aos meus amigos de infância, Mariana, Carolina, Miguel, Maria, Inês e Luís obrigada por estarem sempre perto e pelo apoio mesmo quando a distância se fazia sentir.

À Kateryna, por ser a melhor amiga que a Egas me deu, não há palavras que cheguem para te agradecer. Irás estar sempre no meu coração.

Ao João, pelo amor, apoio, dedicação e por sempre acreditar em mim, obrigada!

À minha família por tornarem este sonho realidade, pais, mano, avós, obrigada do fundo do coração por me acompanharem desde o primeiro dia com o carinho e motivação que vos são tão característicos. Um especial agradecimento ao meu papá e mamã, por todos os sacrifícios que fizeram para que a vossa menina pudesse finalmente ser Médica-Dentista, um obrigada nunca será suficiente, adoro-vos!

RESUMO

Objetivos: Qualificar a superfície de esmalte, histologicamente, quando aplicados agentes remineralizadores e uma resina infiltrante de esmalte, comparando a eficácia remineralizadora em lesões de *white-spot* artificiais da Caseína Fosfopeptídica- Fosfato de Cálcio Amorfo (CPP-ACP) e da resina infiltrante de esmalte (ICON®).

Materiais e Métodos: 13 espécimes de esmalte humano dividiram-se em 5 grupos. Simularam-se lesões de cárie artificiais recorrendo à solução tampão de ácido láctico, pH 5.0, durante 6 dias, em cada grupo. Adicionalmente ao: Grupo A (n=3) - aplicou-se, uma vez por dia, durante 4 semanas, CPP-ACP, alternando esta aplicação com a imersão das amostras em saliva artificial a 37°C; Grupo B (n=3) - aplicou-se uma vez por dia, durante 4 semanas, CPP-ACP, sendo esta aplicação alternada com a imersão das amostras em saliva artificial. Posteriormente, aplicou-se resina infiltrante, ICON®; Grupo C (n=3) - as amostras mantiveram-se em saliva artificial, durante 4 semanas, aplicando-se depois resina infiltrante, ICON®; Grupo D⁺ (n=2) - as amostras mantiveram-se imersas em saliva artificial, durante 4 semanas; Grupo D⁻ (n=2) - as amostras mantiveram-se imersas em água desionizada, durante 4 semanas. Os espécimes foram submetidos a três radiovisiografias: antes/depois da indução de cárie e depois da remineralização. Analisou-se a superfície do esmalte ao microscópio ótico, e fez-se uma análise descritiva e qualitativa das amostras.

Resultados: Os agentes utilizados nos grupos A, B e C apresentaram potencial para remineralizar as WSL. No grupo A e B os prismas de esmalte apresentaram-se homogêneos. No grupo C e D constatou-se uma heterogeneidade nos prismas do esmalte. Não se observaram diferenças significativas nas radiovisiografias.

Conclusões: Os grupos A e B, tratados com CPP-ACP, parecem apresentar maior homogeneidade na superfície do esmalte, no entanto, ao ser uma análise qualitativa não podemos aferir qual o melhor agente remineralizador. Conclui-se que o RVG não é útil para a deteção de achados radiotransparentes no esmalte, induzidos desta forma.

Palavras-Chave: Resina infiltrante, fosfato de cálcio, remineralização, microscopia ótica

ABSTRACT

Objectives: To histologically, qualify the enamel surface when applying remineralizing agents and an infiltrating resin, comparing the remineralizing efficacy in artificial white-spot lesions of Phosphopeptide Casein- Amorphous Calcium Phosphate (CPP- ACP) and an infiltrating enamel resin (ICON®).

Materials and Methods: 13 human enamel specimens were divided into 5 groups. Artificial caries lesions were simulated with lactic acid buffer solution, pH 5.0, for 6 days. Moreover in: Group A (n=3): CPP-ACP was applied once a day for 4 weeks, alternating this application with immersion of samples in artificial saliva at 37°C. Group B (n=3): CPP-ACP was applied once a day for 4 weeks, this application was alternated with the immersion of samples in artificial saliva. Subsequently, infiltrating resin, ICON®, was applied. Group C (n=3): the samples were kept in artificial saliva for 4 weeks, after which time, infiltrating resin, ICON®, was applied. Group D⁺ (n=2): the samples were kept immersed in artificial saliva for 4 weeks. Group D⁻ (n=2): the samples were kept immersed in deionized water for 4 weeks. All specimens from each group were submitted to three radiovisiographies: before and after caries induction and after remineralization. The enamel surface was analyzed under an optical microscope, where a qualitative and descriptive analysis of all samples was made.

Results: All agents used in groups A, B and C showed the potential to remineralize WSL. In group A and B, the enamel prisms were homogeneous. In group C and D, enamel prisms were heterogeneous. No significant differences were observed in the radiovisiographs.

Conclusions: Groups A and B, treated with CPP-ACP, seem to present greater homogeneity on the enamel surface, however, as it is a qualitative analysis, we cannot assess which is the best remineralizing agent. It is concluded that RVG is not useful for detecting radiolucent findings in enamel, treated this way.

Keywords: Infiltrant resin, calcium phosphate, remineralization, otic microscopy

ÍNDICE GERAL

I.	INTRODUÇÃO.....	15
1.	ESMALTE HUMANO	15
1.1.	Constituição e Processo de Formação	15
1.2.	Microestrutura	18
1.3.	Macroestrutura.....	19
2.	SALIVA	20
2.1.	Composição e Produção	20
2.2.	Potencial Remineralizador.....	23
3.	CÁRIE DENTÁRIA.....	24
3.1.	Definição	24
3.2.	Aspetos Bioquímicos.....	25
3.3.	Manifestações Clínicas: White-Spot Lesions	26
3.4.	Película Adquirida	27
3.5.	Diagnóstico de lesões de cárie.....	28
3.6.	Raio-X como meio auxiliar de diagnóstico das lesões cariosas	29
3.7.	ICDAS II: Índice de Classificação	30
4.	REMINERALIZAÇÃO	33
4.1.	Definição	33
4.2.	Flúor.....	34
4.3.	Caseína Fosfopeptídica – Fosfato de Cálcio Amorfo (CPP-ACP).....	37
4.4.	Resina Infiltrante ICON®.....	38
II.	OBJETIVOS E HIPÓTESES	41
1.	OBJETIVOS DO ESTUDO	41
2.	HIPÓTESES DO ESTUDO	41
III.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	43
1.	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	43
2.	LOCAL DO ESTUDO	43
3.	TIPO DE ESTUDO E SELEÇÃO DA AMOSTRA	43
4.	PREPARAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS.....	44

5.	ALEATORIZAÇÃO DAS AMOSTRAS.....	45
6.	GRUPOS DE ESTUDO.....	45
7.	PROCEDIMENTO RADIOVISIOGRAFIA DIGITAL	47
8.	PROCEDIMENTO INDUÇÃO DAS LESÕES DE CÁRIE ARTIFICIAIS (WHITE-SPOTS) ..	48
9.	PROCEDIMENTO SALIVA ARTIFICIAL	49
10.	PROCEDIMENTO DE REMINERALIZAÇÃO DAS WHITE-SPOT LESIONS E DE ESTABILIZAÇÃO DO ESMALTE: APLICAÇÃO DE CPP-ACP E ICON®	50
11.	PROCEDIMENTO DA ANÁLISE HISTOLÓGICA DAS AMOSTRAS AO MICROSCÓPIO ÓTICO	53
11.1	Corte das Amostras.....	54
11.2	Polimento das Amostras	56
11.3.	Processamento e montagem das amostras histológicas.....	58
11.4	Microscopia Ótica (MO)	62
12.	ANÁLISE QUALITATIVA	63
IV.	RESULTADOS	65
1.	RADIOVISIOGRAFIA	65
2.	MICROSCÓPIO ÓTICO (MO): ANÁLISE HISTOLÓGICA QUALITATIVA	67
V.	DISCUSSÃO	77
1.	PERTINÊNCIA DO ESTUDO	77
2.	RADIOVISIOGRAFIA DIGITAL	78
3.	MICROSCOPIA ÓTICA (MO)	78
4.	LIMITAÇÕES DO ESTUDO E PERSPETIVAS FUTURAS	79
VI.	CONCLUSÃO.....	81
VII.	BIBLIOGRAFIA	83
VIII.	ANEXOS	

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Amelogénese vista em cortes histológicos em ratos selvagens com 8 semanas (A-E) e em ratos geneticamente modificados (sem fosforilação da amelogenina, (F-J)). A, F- Fase pré-secretória; B, G - Fase secretória precoce; C, H - Fase secretória; D, I- Fase secretória tardia; E, J- Maturação. Na imagem C observamos um quadrado ampliado à escala de 10 μm , onde vemos os processos de Thomes nos ameloblastos de ratos selvagens. AB - Ameloblastos; DE - Dentina; EN- Esmalte; OD - Odontoblastos; P- Polpa; PAB - Pré-ameloblastos; PL- Camada papilar; SI- Estrato Intermédio; Setas - Processo de Thomes; Asteriscos - Agregados secretórios (SA) (Adaptado de Shin <i>et al.</i> , 2020).....	17
Figura 2. Identificação das amostras na face oclusal.....	44
Figura 3. Grupos de estudo e de controlo categorizados.....	47
Figura 4. Máquina de Radiovisiografia.....	48
Figura 5. Solução de Ácido Láctico.....	49
Figura 6. Solução de saliva artificial.....	50
Figura 7. <i>GC Tooth Mousse</i> Recaldent TM : Pasta de CPP-ACP.....	51
Figura 8. Aplicação do <i>GC Tooth Mousse</i>	51
Figura 9. <i>Kit</i> de Resina Infiltrante ICON® para superfícies vestibulares.....	52
Figura 10. Esquematização das etapas laboratoriais para a aplicação da resina infiltrante ICON®. 1) Condicionamento ácido com <i>Icon-Etch</i> durante 2 minutos; 2) Aspiração, lavagem e secagem; 3) Aplicação do <i>Icon-Dry</i> durante 30 segundos e secar com ar; 4) Infiltração da lesão com <i>Icon-Infiltrant</i> durante 3 minutos; 5) Remover os excessos com algodão e Fotopolimerização durante 40 segundos; Repetir o passo (4) durante 1 minuto e voltar a repetir o passo (5).....	52
Figura 11. Fluxograma do protocolo laboratorial.....	53
Figura 12. Micrótopo de tecidos duros Accutom 50 (Struers).....	55
Figura 13. Corte vestibulolingual (à esquerda); Corte mésio-distal (à direita).....	55
Figura 14. Amostra envolta em cera colante.....	56
Figura 15. Máquina polidora LaboPol- 4® (WS Struers 18-B, Dinamarca).....	57
Figura 16. Medição da espessura da amostra com recurso a craveira.....	57
Figura 17. Xilol (Esquerda) e <i>Entellan</i> (Direita).....	59
Figura 18. Amostra imersa em Xilol.....	59

Figura 19. Sequência laboratorial da montagem das lâminas histológicas. 1) Colocação de <i>Entellan</i> na lâmina com recurso a uma pipeta; 2) Colocação da amostra na lâmina; 3) Colocação da lamela por cima da amostra.	60
Figura 20. Lâminas do grupo A.....	60
Figura 21. Lâminas do grupo B.....	61
Figura 22. Lâminas do grupo C.....	61
Figura 23. Lâminas do grupo D ⁺	61
Figura 24. Lâminas do grupo D ⁻	62
Figura 25. Microscópio ótico.....	62
Figura 26. Fotomicrografia de corte transversal de quatro espécimes do grupo A na zona mesio-cervical (1), disto-cervical (2) e na zona coronária mesial (3) e distal (4) (Magnificação x4). Observa-se o 1º corte da amostra 1 (1) e o 3º corte da amostra 2 (2), onde não se evidenciam diferenças entre ambas as localizações. À direita encontramos o 2º corte da amostra 1 (3) e o 1º corte da amostra 2 onde também não se assinalam diferenças entre si.	67
Figura 27. Fotomicrografia de corte transversal de quatro espécimes do grupo B na zona mesio-cervical (1), disto-cervical (2) e na zona coronária mesial (3) e distal (4) (Magnificação x4). Observa-se o 1º corte da amostra 3 (1) e o 3º corte da amostra 2 (2), onde não se evidenciam diferenças entre ambas as localizações. À direita encontramos o 2º corte da amostra 2 (3) e o 3º corte da amostra 3 onde também não se assinalam diferenças entre si.	68
Figura 28. Fotomicrografia de corte transversal de quatro espécimes do grupo C na zona mesio-cervical (1), disto-cervical (2) e na zona coronária mesial (3) e distal (4) (Magnificação x4). Observa-se o 1º corte da amostra 1 (1) e o 1º corte da amostra 2 (2), onde não se evidenciam diferenças entre ambas as localizações. À direita encontramos o 3º corte da amostra 1 (3) e o 2º corte da amostra 3 onde também não se assinalam diferenças entre si.	68
Figura 29. Fotomicrografia de corte transversal de quatro espécimes do grupo D ⁺ na zona mesio-cervical (1), disto-cervical (2) e na zona coronária mesial (3) e distal (4) (Magnificação x4). Observa-se o 1º corte da amostra 1 (1) e o 1º corte da amostra 2 (2), onde não se evidenciam diferenças entre ambas as localizações. À direita encontramos o 2º corte da amostra 1 (3) e o 1º corte da amostra 2 onde também não se assinalam diferenças entre si.	69

Figura 30. Fotomicrografia de corte transversal de quatro espécimes do grupo D- na zona mesio-cervical (1), disto-cervical (2) e na zona coronária mesial (3) e distal (4) (Magnificação x4). Observa-se o 2º corte da amostra 1 (1) e o 1º corte da amostra 2 (2), onde não se evidenciam diferenças entre ambas as localizações. À direita encontramos o 2º corte da amostra 1 (3) e o 2º corte da amostra 2 onde também não se assinalam diferenças entre si.	69
Figura 31. Fotomicrografia de corte transversal, na zona mesio-cervical do esmalte (Magnificação x4 (1), x10 (2) e x40 (3)), após indução de lesão artificial de <i>white-spot</i> e aplicação de pasta de CPP-ACP. Observa-se, nas três replicadas uma homogeneidade nos prismas de esmalte, onde há um preenchimento das lacunas por depósitos minerais da pasta CPP-ACP.....	70
Figura 32. Fotomicrografia de corte transversal, na zona coronária mesial do esmalte (Magnificação x4 (1), x10 (2) e x40 (3)), após indução de lesão artificial de <i>white-spot</i> e aplicação de pasta de CPP-ACP. Observa-se, nas três replicadas uma mancha homogênea ao longo das Bandas de Hunter Schreger onde há um preenchimento das lacunas por depósitos minerais da pasta CPP-ACP.	70
Figura 33. Fotomicrografia de corte transversal, na zona mesio-cervical do esmalte (Magnificação x4 (1), x10 (2) e x40 (3)), após indução de lesão artificial de <i>white-spot</i> e aplicação de pasta de CPP-ACP e posteriormente de resina infiltrante ICON®. Observa-se, nas três replicadas uma homogeneidade nos prismas de esmalte, onde há um preenchimento das lacunas por depósitos minerais da pasta CPP-ACP.....	71
Figura 34. Fotomicrografia de corte transversal, na zona coronária distal do esmalte (Magnificação x4 (1), x10 (2) e x40 (3)), após indução de lesão artificial de <i>white-spot</i> e aplicação de pasta de CPP-ACP e posteriormente de resina infiltrante ICON®. Observa-se, nas três replicadas uma homogeneidade ao longo do esmalte, onde se evidenciam algumas Bandas de Hunter Schreger.	71
Figura 35. Fotomicrografia de corte transversal, na zona disto-cervical do esmalte (Magnificação x4 (1), x10 (2) e x40 (3)), após indução de lesão artificial de <i>white-spot</i> e aplicação resina infiltrante ICON®. Observa-se uma heterogeneidade ao longo da camada de esmalte com maior evidência das Bandas de Hunter Schreger.	72
Figura 36. Fotomicrografia de corte transversal, na zona coronária distal do esmalte (Magnificação x4 (1), x10 (2) e x40 (3)), após indução de lesão artificial de <i>white-spot</i> e aplicação resina infiltrante ICON®. Observa-se uma mancha heterogênea com maior evidência das Bandas de Hunter Schreger.....	72

Figura 37. Fotomicrografia de corte transversal, na zona mesio-cervical do esmalte (Magnificação x4 (1), x10 (2) e x40 (3)), após indução de lesão artificial de <i>white-spot</i> e conservação em saliva artificial. Observam-se lacunas na superfície do esmalte.....	73
Figura 38. Fotomicrografia de corte transversal, na zona coronária mesial do esmalte (Magnificação x4 (1), x10 (2) e x40 (3)), após indução de lesão artificial de <i>white-spot</i> e conservação em saliva artificial. Observam-se lacunas na superfície do esmalte, estando o esmalte mais heterogéneo.....	73
Figura 39. Fotomicrografia de corte transversal, na zona disto-cervical do esmalte (Magnificação x4 (1), x10 (2) e x40 (3)), após indução de lesão artificial de <i>white-spot</i> e conservação em água desionizada. Observa-se uma superfície heterogénea, onde são visíveis Bandas de Hunter Schreger desorganizadas.....	74
Figura 40. Fotomicrografia de corte transversal, na zona da cúspide distal do esmalte (Magnificação x4 (1), x10 (2) e x40 (3)), após indução de lesão artificial de <i>white-spot</i> e conservação em água desionizada. Observa-se uma larga superfície heterogénea.	74
Figura 41. Esquema das imagens obtidas por MO, na zona cervical, nas diferentes magnificações usadas	75
Figura 42. Esquema das imagens obtidas por MO, na zona coronária, nas diferentes magnificações usadas	76

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1- Critérios correlacionados com o estado do dente, bem como a presença ou não de restaurações no mesmo, tendo por base o ICDAS (<i>International Caries Detection and Assessment System</i>).....	32
Tabela 2- Critérios correlacionados com a presença ou não de cárie e ao seu estado, tendo por base o ICDAS (<i>International Caries Detection and Assessment System</i>).	32
Tabela 3. Radiovisiografias dos espécimes dos grupos A, B, C e D.....	66

LISTA DE ABREVIATURAS

CPP-ACP – Caseína Fosfopeptídica– Fosfato de Cálcio Amorfo
CPP-ACFP – Caseína Fosfopeptídica fluoretada– Fosfato de Cálcio Amorfo
cm – Centímetro
DMG – Dental Milestones Guaranteed
ECM – Electrical Conductance Measurement
FA – Fluorapatite
Fig. – Figura
FOTI – Transiluminação com Fibra Óptica
g. – Grama
o – Graus
°C – Graus Centígrados
HA– Hidroxapatite
ICDAS II – International Caries Detection and Assessment System II
IR – Índice Refratário
kV – Kilovolt
µm – Micrómetro
MEV – Microscópio Eletrónico de Varrimento
min – minuto
mL – Mililitro
mm – Milímetro
mM –Milimolar
MO – Microscópio Ótico
nm – Nanómetro
Ppm – Partes por milhão
% – Percentagem
pH – Potencial Hidrogénico
Rpm – Rotações por minuto
s – Segundos
TEGDMA – Trietilenglicol dimetacrilato
WSL – *White-Spot Lesion*

I. INTRODUÇÃO

1. Esmalte Humano

1.1. Constituição e Processo de Formação

De acordo com Beniash *et al.*, (2019), o esmalte é o tecido mais mineralizado do organismo devido à sua fase inorgânica, com uma arquitetura bem definida, no entanto, é bastante sensível às variações ambientais decorrentes na sua formação. É um tecido duro acelular e avascular que não possui capacidade de auto-reparação ou regeneração, ao contrário de outros tecidos duros, sendo constituído por 96% de matéria inorgânica, na forma de fosfato de cálcio organizado hexagonalmente em cristais de hidroxiapatite (HA); 3% de água e 1% de matéria orgânica, representada por uma rede de pequenas fibras de colagénio, sobretudo do tipo I, que rodeiam cada cristal de HA (Beniash *et al.*, 2019; Farooq *et al.*, 2021; Metwally & Stachewicz, 2020; Ramadoss *et al.*, 2021).

Constitui o revestimento externo da coroa do dente, formando uma barreira que protege o dente de agressões químicas, físicas e térmicas que poderiam causar dano à polpa (Lacruz *et al.*, 2017).

A unidade estrutural do esmalte é denominada de prisma, sendo cada dente constituído por milhões de prismas de esmalte (Ramadoss *et al.*, 2021).

O seu processo de formação é denominado amelogénese, na qual a proteína mais abundante, da matriz de esmalte, a amelogenina, desempenha um papel muito importante (Shin *et al.*, 2020). O esmalte, contrariamente a outros tecidos mineralizados que apresentam natureza conjuntiva, apresenta origem epitelial, mais especificamente ectodérmica (Abou Neel *et al.*, 2016; Lacruz *et al.*, 2017), razão pela qual a constituição dos seus componentes orgânicos e os seus mecanismos de mineralização diferem dos demais. Apresenta-se ao microscópio eletrónico como fibras de cristais mineralizadas que se apresentam unidas umas às outras por uma pequena quantidade de água e proteínas (Farooq *et al.*, 2021).

A amelogénese é regulada pelos ameloblastos, que são células epiteliais especializadas (Ramadoss *et al.*, 2021; Shin *et al.*, 2020). É um processo que envolve a secreção, a criação e o processamento proteolítico das proteínas da matriz do esmalte, que

são responsáveis pelo tamanho, pela forma e pela organização dos cristais existentes em cada prisma de esmalte (Ramadoss *et al.*, 2021).

De um modo geral, a formação do esmalte dentário pode ser agrupada em três estágios: 1) o estágio da formação da matriz, no qual as proteínas envolvidas na amelogênese são produzidas; 2) o estágio da calcificação, no qual são depositados minerais, e a maior parte das proteínas originais é removida; 3) o estágio da maturação no qual o esmalte recém mineralizado sofre um processo final de calcificação, e as proteínas ainda remanescentes são removidas (Nishio, 2008). Todos estes processos, são influenciados por fatores ambientais e genéticos, desta forma, é de esperar que qualquer defeito subjacente ao esmalte dentário advenha de danos decorrentes destes mesmos processos (Nishio, 2008).

Atendendo ao processo de formação dos dentes, denominado de odontogênese, constatamos que este se dá em três etapas distintas - a fase de botão, a fase de capuz e a fase de sino, que ocorrem de forma sequencial (Lacruz *et al.*, 2017). É através do epitélio interno do esmalte, formado pelas células epiteliais da concavidade adjacente ao ectomesênquima, que surgem os ameloblastos, que são células responsáveis pela formação e mineralização da matriz do esmalte (Lacruz *et al.*, 2017; Pham *et al.*, 2017). A amelogênese, envolve duas fases: a secreção, iniciada aquando da presença do prolongamento de Thomes (aparelho secretor altamente especializado), na porção apical dos ameloblastos (Shin *et al.*, 2020) e a maturação (Nishio, 2008). É de salientar que há subdivisões adicionais a estes processos tais como: a fase pré-secretória, a fase secretória precoce, a fase secretória tardia, a fase transitória, a fase pré-absortiva, a fase de maturação precoce e por último a fase de maturação tardia (Lacruz *et al.*, 2017; Ramadoss *et al.*, 2021).

Numa primeira fase há secreção de proteínas da matriz do esmalte pelos ameloblastos para o espaço extracelular, adjacente à junção amelocementária (Pham *et al.*, 2017). Estas proteínas da matriz do esmalte, englobam a amelogenina (cerca de 90%), a ameloblastina, a enamelina (Hu *et al.*, 2016), bem como a enzima enamelisina (MMP-20), controlando, de um modo geral, a biomineralização do esmalte, sendo responsáveis pela regulação e precipitação dos cristais de hidroxiapatite (Farooq *et al.*, 2021; Nishio, 2008). Assim que há deposição mineral, as proteínases do esmalte, encarregam-se de degradar e clivar as proteínas do esmalte, enquanto que os ameloblastos as removem da matriz orgânica, através da via endocítica (Pham *et al.*, 2017; Shin *et al.*, 2020).

A endocitose está intimamente relacionada com a mineralização do esmalte, na medida em que há remoção das proteínas do esmalte da matriz e consequentemente há depósito de minerais (Pham *et al.*, 2017).

Durante a fase de secreção podem distinguir-se quatro populações de células: uma única camada de ameloblastos secretores; o estrato intermédio (constituído por uma ou duas camadas de células); o retículo estrelado; o retículo estrelado composto por um grande grupo de células em forma de estrela; e por fim uma única camada do epitélio externo do esmalte. Os últimos três grupos celulares, vão constituir a camada papilar que é rica em vasos sanguíneos (Lacruz *et al.*, 2017).

Aquando da fase de transição, os ameloblastos tornam-se cada vez mais curtos e perdem o prolongamento de Thomes, assim como a camada papilar que outrora se formou (Lacruz *et al.*, 2017).

Na fase de maturação, e assim que a espessura final da camada de esmalte seja atingida (Shin *et al.*, 2020), é eliminada toda a água e todo o colagénio da matriz orgânica, os ameloblastos desaparecem e não há mais deposição de esmalte (Ramadoss *et al.*, 2021; Thompson, 2020). É importante mencionar que de acordo com os mesmos autores, não há um estado “pré-esmalte”, sendo apenas considerado esmalte, aquele que passa pelo processo de maturação.

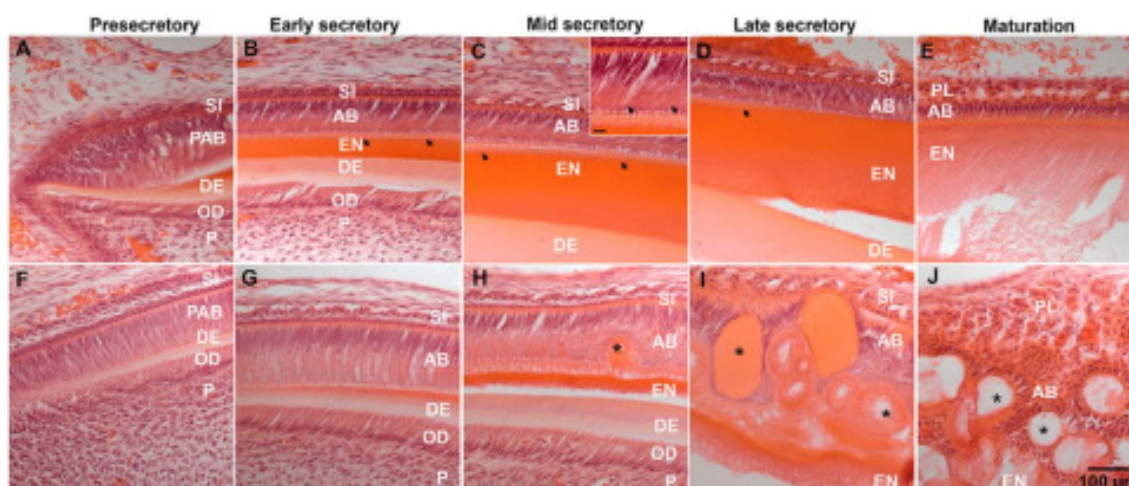


Figura 1. Amelogénese vista em cortes histológicos em ratos selvagens com 8 semanas (A-E) e em ratos geneticamente modificados (sem fosforilação da amelogenina, (F-J)). A, F- Fase pré-secretória; B, G - Fase secretória precoce; C, H - Fase secretória; D, I- Fase secretória tardia; E, J- Maturação. Na imagem C observamos um quadrado ampliado à escala de 10 μm , onde vemos os processos de Thomes nos ameloblastos de ratos selvagens. AB - Ameloblastos; DE - Dentina; EN- Esmalte; OD - Odontoblastos; P- Polpa; PAB - Pré-ameloblastos; PL- Camada papilar; SI- Estrato Intermédio; Setas - Processo de Thomes; Asteriscos - Agregados secretórios (SA) (Adaptado de Shin *et al.*, 2020)

Apesar do crescimento dos cristais de hidroxiapatite se dar em ambas as fases, tanto de secreção como de maturação, é durante a maturação que há uma grande expansão dos cristais em termos de espessura e largura, atribuindo a durabilidade e a dureza ao esmalte dentário (Smith, 1998).

1.2. Microestrutura

A hidroxiapatite constitui cerca de 95% do conteúdo mineral do esmalte, e é representada pela seguinte fórmula estequiométrica: $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (Pitts, 2018). De acordo com Lacruz *et al.*, (2017), a hidroxiapatite constitui-se como o cristal de fosfato de cálcio mais estável quimicamente, bem como o menos solúvel, quando estabelecidas as condições fisiológicas. De salientar, que todos os vertebrados apresentam na sua constituição de esmalte nanocristais de hidroxiapatite de cálcio (Licata *et al.*, 2020).

Há que diferenciar e reforçar que o esmalte é essencialmente constituído por uma forma não estequiométrica da hidroxiapatite, e conseqüentemente, apresenta-se deficiente em cálcio, tendo incorporados diferentes iões, diferindo assim, da hidroxiapatite mineral (Bulina *et al.*, 2020; Lussi *et al.*, 2012). Além disso o seu conteúdo orgânico é bastante importante no que toca à resistência à fratura (Thompson, 2020).

O cristal de hidroxiapatite apresenta-se como uma estrutura hexagonal com arranjos tetraédricos de iões de fosfato e cálcio, coordenados entre si (Lacruz *et al.*, 2017). Há formação de canais, que permitem a difusão de aniões ao longo do cristal de hidroxiapatite, devido ao posicionamento do ião de cálcio. Assim, é possível a substituição de iões hidroxilo, através da sua difusão, por iões de flúor, carbonato ou cloro, que se encontram presentes em solução. Acresce o facto de que, existem elementos intrínsecos, tais como o Na (sódio), o Mg (magnésio), o K (potássio), o Cl (cloro), o S (enxofre), o Fe (ferro), o Cu (cobre) e o Zn (zinco) que estão distribuídos ao longo da estrutura da hidroxiapatite e que se apresentam como impurezas, podendo haver substituição dos iões de cálcio por iões de sódio, magnésio ou zinco (Licata *et al.*, 2020) e substituição dos iões de cálcio e hidroxilo por iões de carbonato (Lacruz *et al.*, 2017).

A concentração destes iões, influencia as propriedades químicas, físicas, biológicas e mecânicas do dente, bem como o rácio entre cálcio e fosfato existente (Licata *et al.*, 2020).

Deste modo, a apatite rica em carbonato acaba por ser muito mais solúvel e suscetível à dissolução causada por ácidos produzidos por bactérias cariogénicas, com

um pH que ronda os 5,5 (Lussi *et al.*, 2012). No entanto, o ião flúor estabiliza a estrutura hexagonal ao encaixar perfeitamente com o ião cálcio na rede cristalina, além de que a substituição do ião carbonato pelo ião flúor, contribui para a formação de fluorapatite, que é muito menos solúvel perante uma descida do pH provocada por ataques químicos, mais concretamente com um pH aproximadamente de 4,7 (Abou Neel *et al.*, 2016; Lacruz *et al.*, 2017; Lussi *et al.*, 2012).

Como supramencionado, os cristais de hidroxiapatite, apresentam-se organizados numa estrutura hexagonal, que culmina com a formação dos prismas de esmalte, paralelos entre si (Ramadoss *et al.*, 2021). Estes prismas, por sua vez, formam uma rede, entrelaçando-se entre si, assemelhando-se a uma estrutura tridimensional (Shin *et al.*, 2020).

Os prismas de esmalte apresentam-se rodeados por uma bainha de matriz orgânica ou *rod sheath*, organizando-se numa estrutura tridimensional (Ramadoss *et al.*, 2021).

Os cristais dos prismas de esmalte maduro, apresentam aproximadamente 50 nm de largura e 10 μm de comprimento (Koldehoff *et al.*, 2020) e têm um diâmetro de aproximadamente 5-8 μm , apresentando-se perpendiculares à junção amelocementária e estendendo-se do esmalte aprismático até à superfície externa do esmalte (Thompson, 2020).

Os prismas de esmalte vão desde a junção-amelodentinária (JAD) até à superfície do esmalte, apresentando uma trajetória ondulada na camada mais interna do esmalte, dando origem às bandas de Hunter-Schreger (Beniash *et al.*, 2019; Lacruz *et al.*, 2017). Estas bandas têm aproximadamente 50 μm de largura e são visíveis devido às diferentes direções que os prismas de esmalte apresentam e pela maneira como refletem e transmitem a luz (Thompson, 2020).

A orientação dos cristais de HA varia consoante a zona do prisma de esmalte, podendo ir desde cristais organizados paralelamente entre si, até uma variação de 65° a 70°, relativamente ao eixo axial (Ramadoss *et al.*, 2021).

1.3. Macroestrutura

O esmalte cobre a coroa do dente, sendo que a sua espessura varia ao longo de toda a coroa dentária, sendo maior nas superfícies vestibulares onde ronda os 2,5 mm e menor em direção ao cérvix (Lynnerup & Klaus, 2019).

O esmalte é translúcido e a sua cor varia de amarelada a branco-acinzentada (Nanci, 2017).

Por ser uma estrutura altamente mineralizada a sua estrutura é difícil de estudar. Ao examinar-se secções de esmalte desmineralizadas, apenas nos é possível observar um espaço vazio nas zonas onde deveria haver esmalte, isto porque a parte mineral dissolveu-se, impossibilitando a sua visualização (Nanci, 2017).

Na superfície externa do esmalte ainda nos é possível distinguir uma estrutura intitulada de periquimata. Esta representa a terminação das estrias de Retzius, distribuindo-se circunferencialmente como linhas horizontais ao longo da coroa do dente (Nanci, 2017).

2. Saliva

2.1. Composição e Produção

A saliva é um fluido biológico com diversas propriedades importantes para a cavidade oral, sendo uma das mais importantes a proteção que confere à mesma (Carpenter, 2013; Hegde *et al.*, 2019; Quintas, 2014), é constituída essencialmente por uma parte orgânica rica em proteínas, aminoácidos, imunoglobulinas e ureia (Ramadoss *et al.*, 2021). Por sua vez, a componente inorgânica da saliva é constituída por catiões (como o sódio, cálcio, potássio, entre outros) e aniões (como cloreto, bicarbonato, flúor, fosfato, entre outros) (Cochrane *et al.*, 2010; Marsh *et al.*, 2015).

A maior parte das proteínas presentes na saliva são secretadas pelas glândulas salivares, a título de exemplo, as mucinas são essencialmente produzidas pelas glândulas submandibulares e sublinguais, bem como pelas glândulas salivares minor, constituindo cerca de mais de 15% do conteúdo proteico da saliva (Carpenter, 2013). As proteínas mais prevalentes na saliva são os péptidos ricos em prolina, a amílase, os péptidos defensores do hospedeiro, as mucinas, a Imunoglobolína A secretória e a anidrase carbónica (Marsh *et al.*, 2015), estas, promovem proteção da superfície do esmalte, atraindo igualmente cálcio, promovendo a remineralização (Hegde *et al.*, 2019). Shetty e colaboradores (2017), defendem que os péptidos ricos em prolina, diminuem a incidência da cárie dentária ao neutralizarem os ácidos produzidos pelas bactérias cariogénicas.

A produção da saliva dá-se nas glândulas salivares, ao nível dos ácinos e dos ductos, tendo como principais funções: lubrificar os tecidos orais e contribuir para a formação do bolo alimentar, promover o *wash-out* da cavidade oral, proteger a mucosa e os dentes da colonização bacteriana extensa, contribuir para a formação de uma película adquirida que protege as superfícies dentárias da dissolução provocada pelos ácidos bacterianos e contribui igualmente para a estabilização das mesmas superfícies, em meio oral (Abou Neel *et al.*, 2016; Dawes *et al.*, 2015; Levine, 2011).

A saliva total refere-se à mistura complexa de fluídos derivados das glândulas salivares, do sulco gengival, do exsudado da mucosa oral, bem como do muco proveniente da cavidade nasal e da faringe em conjunto com remanescentes de comida, bactérias orais não aderidas à mucosa, células epiteliais e sanguíneas descamadas, bem como a restos de medicamentos ou produtos químicos (Pedersen *et al.*, 2018). É uma solução viscosa que contém eletrólitos, sendo os principais o bicarbonato de sódio e o cloreto de sódio, proteínas e células epiteliais da mucosa oral (Levine, 2011)

A produção do fluxo salivar é um processo contínuo que é regulado, positivamente, por um reflexo estimulado pelo paladar e pela mastigação (Chaudhari & Roper, 2010; Hector & Linden, 1999). O fluxo salivar não estimulado representa um fluxo salivar contínuo que é segregado em repouso com o objetivo de cobrir, lubrificar e nutrir todos os tecidos orais (Levine, 2011; Pedersen *et al.*, 2018). Ronda os 0,25 mililitros por minuto (mL/min) – 0,35 mililitros por minuto (mL/min), na maioria dos adultos, resultando de uma baixa estimulação do sistema nervoso autónomo através dos centros superiores, tais como: o córtex orbitofrontal e a amígdala do cérebro que trabalham através dos centros salivares, com o intuito de atuar nas glândulas salivares (Carpenter, 2013).

Por sua vez, a saliva estimulada é produzida face a estímulos mecânicos, quer sejam, gustativos, olfativos ou outros, contribuindo em cerca de 80 a 90% para a produção de saliva diária. A taxa de secreção do fluxo salivar estimulado normal está estipulada como sendo maior que 1mL/min, mais especificamente entre 1 e 1,5 mL/min (Niklander *et al.*, 2017; Proctor, 2016)

Uma pessoa saudável, produz cerca de 1 a 1,5L de saliva por dia, sendo que o fluxo salivar total ronda os 1 mL/min até aos 3 mL/min e caso se encontre diminuído, ronda os 0,7 mL/min- 1,0 mL/min. Contudo, os valores ditos “normais” têm uma grande variação biológica individual, sendo importante monitorizar regularmente estas taxas de secreção (Carpenter, 2013). O conteúdo proteico total na saliva total de um indivíduo com boa

higiene oral ronda os 1,6 mg/mL, sendo que deste, 50% são amilases, 40-45% são proteínas ricas em prolina e 5 a 10% são mucinas (Levine, 2011).

Atendendo à produção da saliva, primeiramente ocorre a secreção acinar primária, em que há formação da saliva primária, isotónica, relativamente ao plasma, de seguida, dá-se a secreção tubular modificada/secundária, em que se forma a saliva secundária, hipotónica em relação ao plasma (Levine, 2011; Pedersen *et al.*, 2018).

Como supramencionado, a saliva possui inúmeras funções, quer sejam protetoras, digestivas, ou de defesa (Pedersen *et al.*, 2018). A saliva lubrifica as superfícies orais sendo fundamental para prevenir a desmineralização do esmalte dentário através da sua capacidade tampão, promovendo igualmente a remineralização do esmalte (Marsh *et al.*, 2015). Deste modo, fatores que aumentem e estimulem o fluxo salivar, quer sejam químicos ou mecânicos, revelam-se como fatores importantes na proteção contra a cárie dentária (Hara & Zero, 2010).

A capacidade tampão da saliva é importante na manutenção de um adequado pH na cavidade oral, tal como contribui para a homeostase da cavidade oral (Peres *et al.*, 2009). Existem assim, três sistemas tampão importantes na cavidade oral: o do bicarbonato/anidrase carbónica, o sistema fosfato e o sistema de proteínas (Levine, 2011). A concentração de bicarbonato é muito superior (cerca de doze vezes) na saliva estimulada do que na saliva não estimulada (Hara *et al.*, 2010).

Enfatizando o sistema tampão bicarbonato/anidrase carbónica, visto que é o mais importante na cavidade oral, constatamos que é um sistema com uma grande dinâmica. De um modo resumido, o ácido láctico produzido pela fermentação das bactérias sacarolíticas reage, reversivelmente com o bicarbonato existente na saliva formando lactato de sódio e ácido carbónico (H_2CO_3). A anidrase carbónica, existente em solução, converte o ácido carbónico em água e dióxido de carbono, sendo este passo irreversível, uma vez que o dióxido de carbono é um gás volátil, sendo perdido para o meio ambiente, perdendo o seu carácter ácido (Levine, 2011; Pedersen *et al.*, 2018). O ácido láctico é transformado no seu sal, o lactato de sódio. O bicarbonato (HCO_3^-) salivar aumenta o pH e, conseqüentemente, a capacidade tampão da saliva, impedindo a desmineralização (Levine, 2011). Os iões de bicarbonato, conseguem neutralizar o ácido láctico e acético, produzidos pelas bactérias cariogénicas, reduzindo deste modo a desmineralização (Peres *et al.*, 2009).

No entanto, o efeito deste sistema tampão pode ser mascarado/influenciado por fatores tais como: a higiene oral, a presença de bactérias cariogénicas, o consumo de açúcar e a exposição a fluoretos (Peres *et al.*, 2009).

São cada vez mais os estudos *ex vivo*, que recorrem a saliva artificial com o intuito de mimetizar o ambiente da cavidade oral (Ionta *et al.*, 2014), uma vez que a saliva recolhida de seres humanos, tende a alterar a sua constituição, podendo inviabilizar todo o estudo, além de que, a sua recolha é um processo demorado (Yetkiner *et al.*, 2014).

Existem diferentes formulações propostas para a saliva artificial (Ionta *et al.*, 2014), onde o conteúdo mineral é superior ao conteúdo proteico, quando comparada com a saliva humana (Mutahar *et al.*, 2017). A saliva artificial, tem sido cada vez mais usada em estudos *ex vivo* onde são aplicados protocolos de desmineralização/remineralização (Mutahar *et al.*, 2017).

2.2. Potencial Remineralizador

Atendendo ao potencial remineralizador da saliva aquando da presença de WSL, estudos indicam que apesar de algumas lesões diminuírem o seu tamanho, a maioria permanece inalterada (Van der Veen *et al.*, 2007) o que reforça a necessidade de meios adicionais extrínsecos de remineralização que forneçam iões como o cálcio, o fosfato e o flúor, tão importantes para aumentar o potencial remineralizador da saliva (Cochrane *et al.*, 2010).

A remineralização dada pela saliva deve-se essencialmente ao facto de a mesma atuar como um transportador de iões de cálcio, fosfato e flúor, promovendo uma supersaturação destes iões, impossibilitando uma eventual desmineralização, com valores de pH fisiológicos (Abou Neel *et al.*, 2016; Farooq *et al.*, 2021; Ramadoss *et al.*, 2021).

Caso ocorra uma descida do pH abaixo de 5,5, há desmineralização da superfície do esmalte devido ao aumento da solubilidade dos cristais de hidroxiapatite e conseqüentemente há perda de mineral pela libertação de iões de cálcio, fosfato e hidroxilo. Deste modo, é possível aferir que a saliva tem um papel protetor no esmalte dentário até um pH de 5,5 (Abou Neel *et al.*, 2016; Farooq *et al.*, 2021).

É importante mencionar que a remineralização dada pela saliva é um processo lento, quando comparada com o uso de agentes remineralizantes, e que o ganho de mineral tende a ser sobretudo na camada superficial devido ao gradiente de baixa concentração que se gera na troca de iões da saliva para a lesão de cárie (Cochrane *et al.*, 2010). Acresce o

facto de que, Dai e colaboradores, em 2019, constataram através dos seus estudos que a saliva artificial, bem como pastas fluoretadas, se revelaram ineficientes para o tratamento de *white-spot lesions*.

3. Cárie Dentária

3.1. Definição

A cárie dentária é uma das doenças crónicas mais prevalentes no mundo e que atinge cerca de 60-90% das crianças à escala global, atingindo igualmente adultos (Pitts *et al.*, 2018; Ramadoss *et al.*, 2021; Shahmoradi *et al.*, 2017). Não é a simples perda de estrutura mineral, é um processo dinâmico, alternando ciclos de desmineralização e remineralização (Philip, 2018).

É definida como uma destruição localizada dos tecidos duros do dente, que se encontram suscetíveis aos produtos ácidos produzidos pelas bactérias aquando da degradação dos hidratos de carbono fermentáveis, provenientes da dieta (Pitts *et al.*, 2017). Nos estágios mais iniciais, apesar de já haver desmineralização subjacente ao esmalte, esta não é detetada através do tradicional exame clínico, bem como do exame radiográfico. Como mencionado, a cárie tanto se manifesta como uma lesão cavitada, como não-cavitada, sendo que a primeira revela um estágio mais avançado da doença (Pitts *et al.*, 2018). É uma doença que tende a aumentar a sua severidade ao longo dos diferentes estágios, inicialmente com diferenças a nível molecular, sub-clínicas na subsuperfície do dente, passando depois para um envolvimento da superfície dentinária (Pitts *et al.*, 2018).

A cárie dentária é uma doença multifatorial que se inicia com mudanças microbiológicas no biofilme, sendo influenciada pelo fluxo salivar e pela sua composição, pela exposição a fluoretos (fatores protetores), pelo consumo de açúcares (dieta) e por fatores genéticos (Pitts *et al.*, 2017; Pitts, *et al.*, 2018; Ramadoss *et al.*, 2021; Shetty *et al.*, 2017).

Caracteriza-se por ser um processo dinâmico, envolvendo ciclos de perda de matéria mineral (desmineralização) e ganho da mesma (remineralização) (El Meligy *et al.*, 2021). Há vários fatores protetores e patológicos que estão envolvidos no processo de formação da cárie dentária e que facilmente alteram o equilíbrio entre “saúde” e

“doença” (Philip, 2018; Pitts *et al.*, 2017). A título de exemplo como fatores patológicos temos: o consumo diário de açúcares, uma baixa exposição a fluoretos, presença de biofilme e de bactérias cariogénicas e uma disfunção das glândulas salivares, por sua vez, como fatores protetores temos: a manutenção de uma dieta saudável, escovagem bidária com pasta fluoretada, aplicação tópica de fluoretos, aplicação de caráter preventivo de selantes de fissuras e uma função das glândulas salivares normal, bem como a presença de iões remineralizantes na saliva (Philip, 2018).

3.2. Aspetos Bioquímicos

As bactérias existentes nas superfícies dentárias, formam microcolónias que estão encapsuladas numa matriz orgânica de polissacarídeos, proteínas e DNA, que são secretadas pelas células, conferindo-lhes proteção e resistência a agentes antimicrobianos (Sahiti *et al.*, 2020).

O mecanismo da cárie dentária é similar para todos os tipos de cáries. As bactérias endógenas (maioritariamente *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus*, bem como *Lactobacillus* spp), conseguem colonizar a superfície do dente e aderir à película adquirida através de interações do tipo recetor-adesão culminando na formação de um biofilme (Pitts *et al.*, 2018). Por definição um biofilme é um conjunto de microorganismos firmemente aderidos entre si e a uma superfície, embebidos numa matriz extracelular com uma origem tripla: bacteriana, da dieta e da saliva. Este biofilme é frequentemente denominado de placa bacteriana, sendo essencialmente constituído por bactérias, polissacarídeos, proteínas e DNA (Chen & Wang, 2010). Estas bactérias produzem ácidos orgânicos fracos como produto da fermentação dos hidratos de carbono provenientes da dieta (Pitts *et al.*, 2018). Estes ácidos, levam a uma redução crítica dos valores de pH, levando à desmineralização da superfície dentária, na medida em que ao atingirem locais suscetíveis, presentes nos cristais de hidroxiapatite, a título de exemplo, impurezas, inclusões, falhas na rede hexagonal dos cristais de hidroxiapatite, ou mesmo zonas com falta de cálcio, promovem a dissolução do cálcio e do fosfato (Chen & Wang, 2010; Sahiti *et al.*, 2020). Caso a difusão dos iões de cálcio, carbono e fosfato para fora do dente, continue, irá iniciar-se a cavitação do mesmo. Estes ácidos, têm a habilidade de produzir iões de hidrogénio que vão dissolver os minerais, libertando deste modo o cálcio e o fosfato, que ficam livres e tendem a difundir para fora do dente (Featherstone, 2000).

Esta desmineralização pode ser revertida nos seus estágios mais iniciais com recurso a cálcio, fosfato e flúor (Sahiti *et al.*, 2020).

3.3. Manifestações Clínicas: *White-Spot Lesions*

A cárie dentária inicia-se como uma WSL (*white-spot lesion*), estas, podem ser revertidas com recurso a flúor (Farooq *et al.*, 2021). No entanto, apenas a terapia com recurso a pastas fluoretadas tem-se vindo a mostrar insuficiente para a reversão das WSL e tem-se optado pela combinação com vernizes de flúor ou mesmo com CPP-ACP, cuja eficácia remineralizadora é similar após 1 mês, no entanto, após 3 meses, o CPP-ACP em combinação com a pasta fluoretada revela-se mais eficaz (Dai *et al.*, 2019).

As WSL podem ser caracterizadas como áreas de esmalte desmineralizado que normalmente se desenvolvem devido à acumulação prolongada de placa bacteriana, sendo o primeiro sinal de cárie dentária (Indrapriyaadharshini *et al.*, 2018). Ocorrem nas superfícies lisas do dente e apresentam um aspeto calcário (*chalky*) e poroso que se deve à perda de mineral subjacente à subsuperfície do esmalte (Indrapriyaadharshini *et al.*, 2018).

As lesões iniciais de cárie em esmalte, podem ser ativas ou não ativas. Para as diferenciar, o clínico deve limpar e secar a superfície do dente e usar uma luz adequada para a sua correta avaliação. Para avaliar a textura da lesão pode fazer-se uso de uma sonda periodontal comunitária e pode constatar-se que as lesões ativas se apresentam como rugosas, opacas e porosas, enquanto, as lesões inativas surgem maioritariamente como lisas e brilhantes (Indrapriyaadharshini *et al.*, 2018).

A desmineralização que inicialmente ocorre na subsuperfície do esmalte, cria poros entre os primas de esmalte (Indrapriyaadharshini *et al.*, 2018) que ao aumentarem de volume irão alterar o índice de refração (IR) da lesão comparativamente com as áreas de esmalte são adjacentes (Sampson *et al.*, 2020). A alteração do índice refratário do esmalte na área cariada de uma WSL é a consequência de uma superfície rugosa e sem brilho, bem como a alteração da reflexão da luz na superfície interna, o que resulta num esmalte visualmente mais opaco, uma vez que no esmalte poroso há uma maior dispersão de luz do que no esmalte são (Gorelick *et al.*, 1982; Indrapriyaadharshini *et al.*, 2018). Quanto mais porosa for a lesão, maior a quantidade de água e ar que consegue penetrar na lesão, alterando o IR (Cazzolla *et al.*, 2018). Estas lesões, caso não tratadas podem evoluir para lesões cavitadas (Cazzolla *et al.*, 2018).

Existem quatro zonas histológicas relevantes numa WSL: 1) a zona de superfície que aparentemente se apresenta intacta e radiopaca ao raio-x, sendo uma zona de remineralização; 2) o corpo da lesão, onde se verifica a maior destruição; 3) a zona escura, que adquire o seu nome devido à sua aparência quando vista em microscopia de luz polarizada, e é onde se dá a remineralização; 4) a zona translúcida em que há uma ausência de contornos estruturais dos bastonetes e um grande aumento de espaço comparado com o esmalte não afetado (Gorelick *et al.*, 1982)

No ano de 2007, Van der Veen *et al.*, constataram a necessidade de aplicar sistemas remineralizantes nas lesões de *white-spot* para impedir a sua progressão. Esta constatação deve-se aos resultados adquiridos nos seus estudos, onde verificaram que após a remoção de brackets ortodônticos, e recorrendo a aparelhos emissores de fluorescência, as WSL mantiveram-se estáveis, sem sinais de regressão, durante um período de dois anos.

3.4. Película Adquirida

A película adquirida é definida como uma capa acelular, amorfa, sem bactérias, estando depositada nas superfícies dentárias entre a superfície do esmalte e o biofilme dentário (Hara *et al.*, 2010). É formada essencialmente por glicoproteínas salivares e proteínas com diferentes origens, nomeadamente salivares, por produtos e compostos bacterianos, pelo fluído gengival crevicular, sangue e restos de comida. É importante salientar que a composição da película adquirida é influenciada por parâmetros físico-químicos ditados pela estrutura das proteínas e pelas características dos cristais de hidroxiapatite, nomeadamente a natureza e número dos recetores e a concentração de determinada proteína (Heller *et al.*, 2016).

Os precursores da formação da película adquirida podem ser proteínas ricas em prolina, estaterinas, histatinas, que se ligam à superfície do dente em poucos minutos (Gibbins *et al.*, 2014). Estes, possuem recetores ligantes de cálcio, os quais se conseguem ligar aos cristais de hidroxiapatite, formando uma película com aproximadamente 10- 20 *nm* em poucos minutos (Siqueira *et al.*, 2012)

A formação desta película envolve dois processos. Inicialmente há adsorção de proteínas às regiões hidrofóbicas do dente através de interações electrostáticas, de seguida, agregados de proteínas ou estruturas micelares aderem aos sítios de ligação previamente expostos, interagindo com a camada hidrofóbica previamente formada, através de interações do tipo proteína-proteína, o que aumenta a espessura da película e

contribui para a formação de uma estrutura globular, característica da película adquirida, nesta fase (Chawhuaveang *et al.*, 2020; Hara *et al.*, 2010; Siqueira *et al.*, 2012).

Na maturação da película adquirida, moléculas de alto peso molecular continuam a aderir à película, contribuindo para o aumento da sua espessura, até que se dá um equilíbrio entre adsorção e dessorção, aproximadamente passadas duas horas, sendo a espessura final da película de 100-1000 nm (Chawhuaveang *et al.*, 2020; Siqueira *et al.*, 2012).

Atendendo à cárie dentária, a película adquirida revela ter um papel importante no seu desenvolvimento, na medida em que contribui para a colonização de microrganismos na superfície dentária, bem como para a difusão de produtos bacterianos e para o transporte de iões minerais (Chawhuaveang *et al.*, 2020).

A composição da película adquirida determina os microrganismos iniciais que irão aderir à superfície dentária, tendo deste modo, uma influência nas propriedades cariogénicas do biofilme dentário (Dawes *et al.*, 2015).

Fatores como o estado da higiene oral, a frequência de consumo de *snacks*, o tipo de alimentação e a frequência do seu consumo diário, influenciam a composição da película adquirida, bem como a colonização bacteriana (Dawes *et al.*, 2015).

Além de servir como um protetor para a desmineralização, a película adquirida atua igualmente como um lubrificante entre os dentes e os tecidos moles e outras estruturas (Hara *et al.*, 2010).

3.5. Diagnóstico de lesões de cárie

Aquando do diagnóstico das lesões de cárie, é importante diferenciar o diagnóstico epidemiológico, do diagnóstico clínico. O primeiro, faz referência à deteção das lesões e à sua classificação, enquanto, o segundo, requer um diagnóstico global com base na história, atividade e risco da doença em si, tendo sempre por base a decisão terapêutica, estando longe de ser um processo objetivo (Sala & Garcia, 2013).

É importante detetar lesões de cárie em estágios cada vez mais precoces, de modo que possamos implementar estratégias minimamente invasivas (Guerrieri *et al.*, 2012).

Ainda não foi estabelecido um método *gold-standard* para diagnosticar lesões incipientes de cárie dentária, na medida em que este teria de ter uma alta sensibilidade, para conseguir detetar a doença, e uma elevada especificidade, para conseguir avaliar a ausência da doença. No entanto, os métodos existentes hoje em dia que nos permitem

diagnosticar lesões iniciais de cárie, englobam o diagnóstico tátil e visual, o diagnóstico radiográfico, e mais recentemente, métodos como transiluminação com fibra ótica (FOTI), aparelhos com recurso a fluorescência e até aparelhos com condutividade elétrica (ECM) têm sido cada vez mais usados (Guerrieri *et al.*, 2012).

Ambos os diagnósticos tátil e visual, bem como o radiográfico apresentam por si só, uma sensibilidade moderada, sobretudo por estarem dependentes do operador que os executa, no entanto, quando combinados, melhoram a sua sensibilidade e especificidade (Ewoldsen & Koka, 2010).

É importante denotar que a inserção da sonda exploratória, aquando do diagnóstico clínico pode danificar lesões de *white-spot* potencialmente reversíveis, como também pode transferir microorganismos de um local para o outro (Vaswani *et al.*, 2018).

Ambos os diagnósticos clínico e radiográfico, têm sido usados pelos clínicos para diagnosticar lesões de cárie, no entanto, a subjetividade associada a estes métodos e as limitações levaram à necessidade de se desenvolverem novas tecnologias (Iranzo-Cortés *et al.*, 2017).

O diagnóstico histológico é o método *gold standard* para a deteção da cárie dentária, no entanto, em situações clínicas, é bastante difícil, se não, impossível, colocar este diagnóstico em prática, na medida em que seria necessário um método que não destruísse a estrutura dentária e que nos permitisse aceder à perda de mineral (Rodrigues *et al.*, 2011).

3.6. Raio-X como meio auxiliar de diagnóstico das lesões cariosas

A cárie dentária ao ser um processo multifatorial, complexo, contínuo e dinâmico, revela-se difícil de avaliar e diagnosticar. Acresce o facto de que, nos estágios mais iniciais, a cárie pode ser controlada com recurso a tratamentos não invasivos, sendo o objetivo principal do nosso diagnóstico enquanto clínicos, a deteção precoce dos sinais clínicos desta doença (Belém, 2011).

As lesões de cárie nas superfícies oclusais apresentam-se como as de maior dificuldade de diagnóstico devido à sua complexidade anatómica, o que porventura as torna mais difíceis de higienizar, quando comparadas com superfícies lisas (Medeiros, 2011). Além disso, cada vez mais, têm sido reportados casos de presença de cárie dentária em superfícies aparentemente hígidas, o que requer uma maior atenção e rigor no diagnóstico por parte do Médico-Dentista (Fors *et al.*, 2021; Medeiros, 2011). As lesões

cariosas em esmalte apenas são detetadas com recurso ao raio-x quando há perda de mineral a partir de 30%, razão pela qual a maioria é indetetável com este método (Vaswani *et al.*, 2018; Wenzel *et al.*, 1991).

O exame radiográfico é um meio auxiliar de diagnóstico muito importante e cada vez mais usado na prática da Medicina Dentária, apresentando um papel relevante no diagnóstico da cárie dentária. O exame radiográfico é sobretudo útil no diagnóstico de lesões de cárie em dentina (Medeiros, 2011; Singh *et al.*, 2016).

A radiografia, como meio auxiliar de diagnóstico da cárie dentária pode subestimar a profundidade da lesão cariosa, apresentando-se como um método com uma baixa sensibilidade, especialmente na deteção de cáries incipientes (Foros *et al.*, 2021).

O uso de radiografias tradicionais para o diagnóstico da cárie dentária peca devido a aspetos como: o brilho, a escala de cinzentos e o contraste, facto pelo qual se tem optado cada vez mais pela radiovisiografia (RVG). Acresce o facto do RVG apresentar várias vantagens relativamente ao método convencional, tais como: grande resolução de detalhes devido às inúmeras especificações que contém, como filtros, opção de zoom e densitometria, além de apresentar uma baixa radiação ionizante. Constitui igualmente um método mais rápido e fiável, possibilitando o armazenamento de imagens, sem perder qualidade para um futuro *follow-up* (Vaswani *et al.*, 2018).

Diversos autores compararam a eficácia na deteção da cárie dentária, ao usar a radiografia convencional e a radiografia digital e constatou-se que ambos se revelaram igualmente eficazes na deteção e diagnóstico de lesões de cárie dentária, apresentando igual sensibilidade, no entanto, em termos de acurácia o sistema digital parece ser superior (Tovo *et al.*, 2003).

3.7. ICDAS II: Índice de Classificação

O *International Caries Detection and Assessment System* (ICDAS), é um índice visual que permite a deteção de cáries em diferentes estádios, sendo reconhecido internacionalmente (Dai *et al.*, 2019). É baseado na inspeção visual, podendo opcionalmente fazer-se uso a uma sonda exploratória comunitária, para a palpação da textura da lesão ou a fim de remover debris (Braun *et al.*, 2016). Este índice classifica os estágios da cárie dentária baseados na sua atividade e extensão histológica (Pitts *et al.*, 2013).

Atendendo aos métodos tradicionais de diagnóstico da cárie dentária, estes envolvem o diagnóstico visual, o tátil e o radiográfico, os quais são usados já há muito tempo (Vaswani *et al.*, 2018). No entanto, são métodos subjetivos e com pouca reprodutibilidade (El-Housseiny *et al.*, 2002) e é necessário cerca de 30% a 40% de perda mineral para que seja observada na radiografia (Wenzel *et al.*, 1991).

Estudos demonstraram que o ICDAS tem uma grande consistência, sensibilidade e reprodutibilidade, bem como uma boa correlação com o exame histológico. Além disso, revelou-se o melhor índice para detetar alterações no esmalte, quando comparado com outros métodos de diagnóstico, tais como radiografias *bitewing* e aparelhos de fluorescência (Jablonski-Momeni *et al.*, 2008; Rodrigues *et al.*, 2008).

Recentemente tem-se vindo a desenvolver métodos cada vez mais precisos para a deteção da atividade da cárie dentária nos seus estágios mais iniciais, com uma precisão tão grande como aquela observada no diagnóstico histológico (Dai *et al.*, 2019), a título de exemplo temos a tomografia de coerência ótica- sensível à polarização (*Polarization sensitive optical coherence tomography* (PS-OCT)).

O ICDAS II está concebido de modo a detetar 6 estádios de lesão de cárie, desde as lesões mais iniciais causadas pela desmineralização subjacente ao processo cariioso, até lesões mais extensas com grandes cavitações (Ismail *et al.*, 2007; Sala & Garcia, 2013). De acordo com Ismail *et al.*, (2007), este índice abrange todo o tipo de cáries coronais (fossas e fissuras, mesio-distal e vestibulo-lingual), bem como de cáries radiculares e ainda de cáries associadas a restaurações e selantes (CARS).

O ICDAS II é definido por dois dígitos, sendo que o primeiro dígito faz referência ao estado da superfície dentária, ou seja, se está íntegra ou restaurada. Por sua vez, o segundo dígito refere-se à existência ou não de uma lesão de cárie e ao seu estado (Ismail *et al.*, 2007; Sala & Garcia, 2013).

De um modo geral, as WSL podem ser classificadas com o dígito 1 ou 2. Sendo que o dígito 1 faz referência a uma mudança visual em esmalte, na qual, com o dente húmido não há mudança na cor que indique a existência de cárie dentária, no entanto, após secagem (aproximadamente 5 segundos), é visível uma mancha opaca compatível com lesão inicial de cárie (Dai *et al.*, 2019; Ismail *et al.*, 2007).

Em contrapartida, o dígito 2 faz referência a uma mudança visual notável em esmalte quando observamos o dente húmido (Dai *et al.*, 2019; Ismail *et al.*, 2007).

Em comparação com o esmalte são, as WSL são brancas e opacas, sendo frequentemente observadas na superfície vestibular dos dentes anteriores, e na área

interproximal dos dentes posteriores como lesões de classe II incipientes (Perdigão, 2019).

Atendendo ao índice refratário (IR) do esmalte são, este ronda os 1,62, enquanto que uma WSL hidratada com saliva apresenta um IR de 1,33. Esta diferença nos índices de refração afeta a dispersão da luz, dando um aspeto opaco às WSL. Por sua vez, quando secos, a saliva presente nas porosidades das WSL é substituída por ar, cujo IR é de 1,0. Visto que a diferença de índices refratários é maior entre a hidroxapatite e o ar, é de esperar que as WSL se tornem mais evidentes num dente desidratado (Dai *et al.*, 2019).

As tabelas 1 e 2 são representativas dos códigos usados no ICDAS II.

Tabela 1- Critérios correlacionados com o estado do dente, bem como a presença ou não de restaurações no mesmo, tendo por base o ICDAS (*International Caries Detection and Assessment System*).

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, em ouro ou metalo-cerâmica ou faceta
Código 7	Restauração fraturada ou perdida
Código 8	Restauração provisória

Tabela 2- Critérios correlacionados com a presença ou não de cárie e ao seu estado, tendo por base o ICDAS (*International Caries Detection and Assessment System*).

Códigos	Descrição dos critérios clínicos
Código 0	Esmalte são
Código 1	Alterações de esmalte visíveis com o 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 de dentina
Código 6	Extensa cavidade com exposição de dentina

4. Remineralização

4.1. Definição

Por definição, a remineralização do esmalte é um processo de reparo natural do corpo humano para lesões não cavitadas na subsuperfície do dente, reconstituindo o conteúdo mineral perdido (Sahiti *et al.*, 2020).

O processo de remineralização tem como objetivo restituir a perda de iões por parte do esmalte (Ramadoss *et al.*, 2021). É um processo caracterizado pela deposição de cálcio e fosfato no esmalte desmineralizado (Lynch & Smith, 2012), culminando o seu sucesso com a deteção precoce das lesões cáries (Ramadoss *et al.*, 2021).

Para considerarmos um agente remineralizante como eficiente, este tem de aumentar a remineralização e diminuir a desmineralização, sendo capaz de ficar retido no esmalte para exercer a sua ação. Idealmente têm de conseguir precipitar rapidamente numa superfície parcialmente desmineralizada e tornar a apatite da estrutura dentária, numa apatite mais estável e mais ácido-resistente (Borges *et al.*, 2011). É necessário que isto aconteça na presença de saliva e antes de uma nova desmineralização ocorrer, para que não entre em contacto com o mineral recém-precipitado e este seja perdido. Estes autores, também constataram que os minerais que são absorvidos pelo esmalte podem servir como um reservatório aquando de um ataque ácido, pois podem ser libertados na sua fase fluida em torno dos cristais de hidroxiapatite, servindo como um substrato para a remineralização (Borges *et al.*, 2011).

De acordo com Borges *et al.*, (2011) um agente remineralizante tem de cumprir alguns requisitos tais como: ser seguro para o ser humano e ter uma bioatividade satisfatória; (2) despoletar uma precipitação rápida em dentes parcialmente desmineralizados; (3) transformar-se numa apatite estável e resistente a futuros ataques ácidos; (4) ter uma ação benéfica em conjunto com o uso de flúor; (5) ser mais eficaz que a desmineralização que ocorre naturalmente após a erosão pela saliva; (6) ser ativo tanto na superfície como na subsuperfície da lesão e conseguir difundir-se, através do biofilme, até ao interior da lesão na subsuperfície.

Para abrandar a progressão da lesão, temos de promover o bloqueio da lesão de modo a alcançarmos a regressão da lesão (Yavuz & Kargul, 2021). Deste modo, é necessário a criação de estratégias preventivas e intercetivas que permitam a remineralização de lesões incipientes de cárie (Yavuz & Kargul, 2021).

A chave para a remineralização do esmalte, é a reposição dos iões perdidos, conseguindo estes, obliterar os poros do tecido desmineralizado (Ramadoss *et al.*, 2021).

Atendendo aos novos sistemas de remineralização, estes podem regenerar o corpo da lesão (péptidos biomiméticos) ou podem promover iões que favorecem o ganho de mineral na subsuperfície do dente, como os sistemas de fosfato de cálcio (González-Cabezas *et al.*, 2018; Philip, 2018). Deste modo, tem-se vindo a caminhar para uma perspetiva cada vez mais minimamente invasiva, onde se preza a remineralização a título de conservar o máximo de estrutura dentária possível, melhorando tanto os resultados clínicos como a experiência para o nosso paciente (Pitts & Wright, 2018).

O gradiente de porosidade na superfície de uma lesão cariiosa em esmalte é inferior a 5%, variando o volume dos poros consoante as diferentes regiões de uma WSL: 10 a 20% no corpo da lesão; 2 a 4% na zona escura e 1% na zona translúcida (Robinson *et al.*, 2000).

É importante sublinhar que a remineralização nem sempre é suficiente para tratar eficazmente as lesões de cárie, na medida em que a desmineralização e a remineralização são processos cíclicos e basta haver um desequilíbrio nestes processos para que a reparação da lesão não seja possível (Yavuz & Kargul, 2021).

A desmineralização começa na subsuperfície do esmalte (Yavuz & Kargul, 2021). Lesões incipientes podem ser remineralizadas com agentes remineralizantes caso a camada superficial esteja íntegra (Pitts & Wright, 2018).

4.2. Flúor

O uso tópico de flúor é um método amplamente reconhecido para a remineralização de lesões cariosas em esmalte (González-Cabezas *et al.*, 2018), esta, dá-se pela formação da fluorapatite (Dai *et al.*, 2019).

A formação da fluorapatite dá-se aquando da diminuição do pH salivar, em que há troca dos grupos hidroxilo dos cristais de HA pelo flúor (Ramadoss *et al.*, 2021). O flúor presente nos produtos fluoretados, ao reagir com o ião cálcio presente na saliva origina o fluoreto de cálcio (CaF_2) que irá aumentar a resistência do esmalte à desmineralização (Dai *et al.*, 2019; Lussi *et al.*, 2012; Shahmoradi *et al.*, 2017). Aquando de um ataque ácido, em que há diminuição do pH, os iões flúor são libertados do complexo CaF_2 , no entanto, a pH's neutros, este complexo mantém-se estável na superfície do esmalte (Lussi

et al., 2012). Assim, a menor solubilidade da fluorapatite, relativamente à HA confere maior resistência ao esmalte (Santos *et al.*, 2019).

A existência de íões de cálcio e de fosfato na saliva torna-se indispensável para que o processo de remineralização ocorra (Ramadoss *et al.*, 2021). O complexo de fluoreto de cálcio é considerado a maior fonte de íões flúor aquando de um ataque ácido, estes íões irão inibir a desmineralização e promover a remineralização (Lussi *et al.*, 2012).

O cálcio e o fosfato, provenientes da saliva ou de outras fontes tópicas difundem para o dente e em conjunto com o flúor, reparam os cristais pré-formados ao invés de formarem novos (Featherstone, 2000), ou seja, o flúor tem a habilidade de aderir à superfície desmineralizada e captar íões, resultando num ganho de mineral, formando a fluorapatite, que é mais resistente ao ataque ácido do que a hidroxiapatite (Dai *et al.*, 2019; Philip, 2018).

Além do mecanismo de ação supramencionado, apesar de não muito bem esclarecido, o flúor atua também inibindo a síntese de ácido pelas bactérias (Lussi *et al.*, 2012; Santos *et al.*, 2019).

A biodisponibilidade dos íões de flúor depende da existência de reservas iónicas nos dentes, na saliva, na placa dentária e na mucosa oral, sendo que, essas reservas garantem o equilíbrio e a estabilidade na cavidade oral, resultando o seu desequilíbrio no início da desmineralização na superfície do esmalte (Ramadoss *et al.*, 2021).

Estratégias comunitárias como a fluoretação das águas, têm sido amplamente utilizadas como medida preventiva nas populações para travar a progressão da doença cárie (Ramadoss *et al.*, 2021). Esta medida, garante a disponibilidade de uma concentração de 1 ppm de flúor, considerada ideal, para inibir a desmineralização do esmalte, no entanto, excessos deste íão podem levar à fluorose dentária onde há uma superfície porosa por baixo da área hipermineralizada, levando ao enfraquecimento do esmalte (Ramadoss *et al.*, 2021).

Lussi e colaboradores (2012) defendem que pequenas quantidades de flúor dispersos na cavidade oral, em solução, inibem a desmineralização de uma maneira mais eficaz do que a FAP (fluorapatite) incorporada no esmalte, tendo os íões de flúor livres em solução um papel muito mais importante na prevenção da cárie dentária.

É importante salientar que apesar de o flúor permanecer o *gold-standard* para a remineralização de lesões cáries em esmalte, tem-se vindo a assistir a um declínio na sua eficácia em alguns grupos populacionais devido ao consumo excessivo de alimentos processados e com excesso de açúcar, o que resulta numa redução do potencial

remineralizador do flúor. Sendo possível concluir que em dietas altamente cariogénicas o flúor e a saliva não são métodos suficientes para a remineralização de lesões de cárie (Philip, 2018).

O conteúdo de flúor presente em esmalte são é inferior àquele presente numa WSL, visto que a última já foi submetida a várias fases de desmineralização e remineralização (Lussi *et al.*, 2012). Ao se analisar as diferentes áreas de uma WSL ao microscópio, é possível constatar que na área superficial há uma concentração muito alta de iões flúor (acima de 1100 ppm), ao contrário de áreas de esmalte sãs em que apenas se detetou 450 ppm de flúor. Ao caminharmos para o corpo da lesão, a concentração de flúor diminui abruptamente para 150 ppm e nas camadas mais profundas de esmalte as concentrações são de 100 ppm (Lussi *et al.*, 2012). A elevada concentração de flúor na superfície mais externa do esmalte, prende-se com o facto de que esta, está constantemente exposta à saliva (Pajor *et al.*, 2019).

A concentração aumentada de flúor na região mais superficial de uma WSL deve-se ao facto de que os cristais desmineralizados existentes na superfície porosa da WSL, servem como núcleos para o ganho de nova matéria mineral, resultando numa camada mineral superficial rica em flúor, pobre em carbonato e resistente ao ataque ácido, deste modo, conclui-se que as lesões iniciais de cárie não devem ser removidas mecanicamente (Lussi *et al.*, 2012).

Os produtos fluoretados apresentam-se em diferentes aspetos (géis, vernizes, colutórios e pastas) concentrações e modos de aplicação, sendo o efeito principal do flúor, tóxico (Santos *et al.*, 2019).

A concentração de flúor nas pastas de dentes varia de 1000 a 1500 ppm, sendo os fluoretos mais usados o fluoreto de sódio, o monofluorofosfato e o fluoreto estanhoso (Santos *et al.*, 2019). Existem igualmente pastas fluoretadas com alta concentração de flúor (5000 ppm de flúor) que se destinam a pacientes com alto risco de cárie ou em tratamento ortodôntico (Silva-Fialho *et al.*, 2021).

Os colutórios fluoretados podem ser compostos por fluorofosfato acidulado, fluoreto de estanho, fluoreto de amónio e fluoreto de amina, existindo duas principais concentrações: 0,05% (225 ppm de flúor) para uso diário e 0,2% (900 ppm de flúor) para uso semanal (Santos *et al.*, 2019).

Relativamente aos géis fluoretados, estes contêm 12.300 ppm de flúor, sendo produtos com alta concentração de flúor, bem como os vernizes de flúor (22.600 ppm de flúor) (American Academy of pediatric Dentistry, 2020), devendo apenas ser prescritos e

manipulados pelo Médico-Dentista em pacientes com alto risco de cárie (Santos *et al.*, 2019).

Uysal e colegas (2010), defendem que apenas a escovagem com uma pasta fluoretada não é suficiente para prevenir a progressão de WSL provenientes do uso de brackets ortodônticas. Enfatizando assim, o facto de serem necessários tratamentos remineralizadores alternativos para tratar as WSL.

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

Fármacos como o flúor, os vidros bioativos e os fosfopéptidos de caseína têm sido os mais utilizados para a remineralização do esmalte (Quintas, 2014). A aplicação de CPP-ACP é uma das muitas técnicas propostas para promover a remineralização e reduzir a ocorrência de WSL bem como de cáries dentárias (Indrapriyaadharshini *et al.*, 2018).

Estes sistemas de remineralização foram desenvolvidos com base na ideia de que a digestão triptica do caseinato de leite produz fosfopéptidos de caseína multifosforilados (CPP), o que aumenta substancialmente a solubilidade da proteína do leite, bem como a capacidade de estabilizar iões de cálcio e fosfato (Indrapriyaadharshini *et al.*, 2018).

A caseína é uma proteína do leite bastante insolúvel, constituindo cerca de 80% das proteínas no leite bovino (Gulec & Goymen, 2019). Os fosfopéptidos de caseína são capazes de estabilizar o fosfato e o cálcio ao formar um complexo que contém fosfato de cálcio amorfo (ACP) (Gulec & Goymen, 2019; Indrapriyaadharshini *et al.*, 2018). São considerados bioativos, na medida em que necessitam de ativação por hidrólise enzimática ou química para se tornarem ativos (Oliveira *et al.*, 2014). É um nanocomplexo que promove um reservatório, com consequente libertação, de cálcio e fosfato de modo a manter um estado de super-saturação, destes iões na saliva (Hua *et al.*, 2020; Indrapriyaadharshini *et al.*, 2018; Ramadoss *et al.*, 2021), promovendo iões para a remineralização do esmalte, favoráveis à formação de hidroxiapatite (Borges, 2011). Os nanocomplexos de ACP, estão difundidos pela saliva, criando um gradiente de difusão que lhes permite localizarem-se na placa supragengival (Philip, 2018).

O mecanismo de ação do CPP-ACP pode ser subdividido em: 1) promover a supersaturação de iões de cálcio e fosfato na saliva, promovendo a sua disponibilidade; 2) contribuir para a capacidade tampão da saliva ao manter altos os níveis de iões, impedindo uma descida do pH; 3) promover a remineralização da HA; 4) Reduzir e prevenir a desmineralização da HA; 5) Atuar nos microorganismos presentes no biofilme;

6) Manter uma concentração de iões na superfície da lesão cariiosa para promover a remineralização (Hua *et al.*, 2020). É de salientar que os nanocomplexos de CPP-ACP exibem um efeito de sinergismo na presença de flúor, ao formar fosfopéptido de caseína-fosfato de cálcio amorfo fluoretado (CPP-ACFP) (Yavuz & Kargul, 2021).

O potencial cariostático atribuído ao CPP-ACP deriva da sua capacidade de estabilizar iões como o cálcio e o fosfato mantendo um estado de supersaturação destes mesmos iões no meio oral (Oliveira, 2014). Aquando de um ataque ácido, há libertação de iões de cálcio e fosfato o que facilita a remineralização e inibe a desmineralização (Indrapriyaadharshini *et al.*, 2018).

Estudos defendem que o CPP é um bom transportador de flúor, na medida em que o consegue transportar para dentro da lesão cariiosa, aumentando a sua permeabilidade, deste modo, devido há maior concentração de flúor há maior formação de fluorapatite e hidroxiapatite, promovendo uma maior remineralização na zona afetada (Dai *et al.*, 2019).

As WSL remineralizadas com recurso ao CPP-ACP, revelaram apresentar melhor estética e força, bem como maior resistência aquando de um novo ataque ácido, quando comparadas com aquelas submetidas a remineralização com flúor (Philip, 2018).

A concentração dos produtos de CPP-ACP revelou-se importante, na medida que possui um efeito dose-dependente na remineralização das lesões de cárie em esmalte (Philip, 2018).

Produtos como o *Tooth Mousse*, mostraram ser eficazes em remineralizar lesões de esmalte desmineralizadas ao criarem uma supersaturação de iões cálcio e fosfato na saliva, permitindo a precipitação de iões fosfato de cálcio na superfície do dente desmineralizada (Guzmán-Armstrong *et al.*, 2010; Indrapriyadharshini *et al.*, 2018).

Jayarajan *et al.*, (2011), demonstraram que o CPP-ACP tem um maior potencial remineralizador do que a saliva artificial.

4.4. Resina Infiltrante ICON®

Atendendo ao termo infiltração, no que toca a medicina, este pode ser definido como o ato ou o processo de infiltrar uma substância em poros ou cavidades (Kielbassa *et al.*, 2009). Deste modo, segundo os mesmos autores, este termo parece ser o mais adequado para descrever o tratamento de WSL com recurso a resinas de baixa viscosidade com alta capacidade de penetração na subsuperfície das lesões de cárie em esmalte.

As resinas infiltrantes são tratamentos restauradores minimamente invasivos que envolvem a penetração de resina dentro da lesão de *white-spot*, onde houve uma perda mínima de esmalte, ocluindo as microporosidades existentes (El Meligy *et al.*, 2021; Sampson *et al.*, 2020). Esta técnica faz uso do ácido hidrocloreídrico (HCl) a 15%, durante 20 segundos, para remover a camada superficial de esmalte, expondo a desmineralização subjacente à *white-spot*, seguido de lavagem, secagem e desidratação da superfície com etanol (95% a 99%)- *Icon Dry*- tornando a superfície externa mais permeável, infiltrando-se depois uma resina de baixa viscosidade à base de dimetacrilato de trietilenoglicol na estrutura porosa subjacente (El Meligy *et al.*, 2021; Khoroushi *et al.*, 2017; Kielbassa *et al.*, 2009; Perdigão, 2019; Yetkiner *et al.*, 2014).

Esta resina é caracterizada por ter um índice refratário de 1,475, semelhante ao de esmalte são (IR = 1,65), conseguindo camuflar as WSL e ainda reforçar a estrutura de prismas de esmalte que se apresenta comprometida (Sampson *et al.*, 2020; Yetkiner *et al.*, 2014).

É sabido, através de estudos histológicos, que as lesões de cárie em esmalte podem ser embebidas em água ou quinolina devido à presença de microporosidades aumentadas, nas diferentes áreas histológicas (Kielbassa *et al.*, 2009). Acresce o facto de que estas microporosidades em conjunto com os espaços inter-cristalinos mais largos, atuarem como um meio de difusão para ácidos e minerais dissolvidos, deste modo, é possível infiltrar em lesões incipientes, líquidos, tais como resinas de baixa viscosidade.

De acordo com Dayila *et al.*, em 1975, nos seus estudos, uma infiltração de adesivo com uma profundidade de 60 micras mostrou-se suficiente para prevenir uma desmineralização futura.

Atendendo ao ICDAS II, lesões de cárie classificadas com os dígitos 1 ou 2 podem ser eficazmente remineralizadas com recurso a fluoretos e soluções contendo CPP-ACP. Por sua vez, lesões classificadas com o dígito 2, necessitam de medidas adicionais, mais evasivas, devido à sua profundidade, tais como: erosão-infiltração, branqueamento e microabrasão (Cazzolla *et al.*, 2018; Gúzman-Armstrong *et al.*, 2010).

Preencher as porosidades do esmalte com uma resina adesiva, reforça os cristais de esmalte do corpo da WSL (Kielbassa *et al.*, 2009). É considerada uma técnica estética, bem como um procedimento minimamente invasivo no tratamento de lesões de cárie incipientes efetivo (Perdigão, 2019). Provou também ser uma técnica mais eficaz, esteticamente, quando comparada com a aplicação de flúor ou de CPP-ACP no tratamento de WSL (El Meligy *et al.*, 2021).

De acordo com Cazzolla *et al.*, (2018), o uso de resinas infiltrantes é um tratamento minimamente evasivo eficaz no tratamento de WSL, permitindo um resultado estético, harmonioso e duradouro em apenas uma sessão.

O sucesso do tratamento com as resinas infiltrantes depende de vários fatores, entre os quais as características intrínsecas da WSL e a infiltração completa da resina em todo o corpo da lesão, de maneira a formar uma camada híbrida em esmalte (Perdigão, 2019).

O uso de resinas infiltrantes em lesões porosas fortalece mecanicamente a lesão ao fechar permanentemente os poros expostos, ajuda a prevenir a formação de novas cáries, permitindo a estabilidade das WSL, atrasa a necessidade de uma restauração, alivia a sensibilidade pós-operatória e impede a entrada de alimentos nos poros expostos (Cazzolla *et al.*, 2018; El Meligy *et al.*, 2021).

El Meligy *et al.*, em 2021, ao elaborarem uma investigação cujo mote consistia na aplicação de ICON em cáries proximais incipientes, concluíram que houve um aumento na rugosidade e na dureza no esmalte tratado com recurso ao ICON comparativamente com o esmalte apenas desmineralizado. Assim, o ICON revela-se eficaz ao penetrar nos poros das WSL, aumentando a dureza do esmalte, tornando-o resistente à cárie, no entanto, parece também propiciar a acumulação de mais placa bacteriana.

Shimaa *et al.*, em 2016, ao avaliarem a profundidade de infiltração em lesões incipientes de esmalte, tratadas com ICON e com CPP-ACP, constataram que o ICON apresentava o maior valor de profundidade de infiltração, seguido do CPP-ACP.

II. OBJETIVOS E HIPÓTESES

1. Objetivos do estudo

Constituem-se como objetivos de estudo, após a indução de lesões artificiais de cárie dentária - *white-spot*:

- Qualificar histologicamente a superfície de esmalte, aquando da aplicação dos agentes remineralizadores e da resina infiltrante de esmalte.
- Comparar o efeito remineralizador de diferentes agentes, tais como a Caseína Fosfopeptídica- Fosfato de Cálcio Amorfo, uma resina infiltrante de esmalte por comparação com o grupo de controlo.
- Observar as lesões induzidas, com o RVG como meio auxiliar de diagnóstico.

2. Hipóteses do estudo

- As amostras desmineralizadas e imersas em saliva apresentam potencial reparador devido às propriedades inerentes à saliva;
- As amostras desmineralizadas e posteriormente reparadas com CPP-ACP apresentam um maior potencial na regressão de lesões incipientes de cárie comparativamente com as amostras imersas em saliva;
- As amostras desmineralizadas e reparadas com CPP-ACP, em que foi aplicado posteriormente ICON, apresentam um maior potencial na regressão de lesões incipientes de cárie do que as amostras reparadas com CPP-ACP;
- As amostras desmineralizadas e com posterior aplicação de ICON, apresentam um maior potencial na regressão de lesões incipientes de cárie comparativamente com as amostras imersas em saliva artificial.

III. MATERIAIS E MÉTODOS

1. Considerações Éticas

O projeto de investigação em questão, foi submetido à Comissão de Ética do Instituto Universitário Egas Moniz, tendo sido aprovado. Os dentes do estudo foram cedidos pelo banco de dentes da Clínica Dentária Universitária Egas Moniz. Os mesmos foram preservados até 6 meses, após a sua extração, numa solução diluída de cloramina T a 0,5% e água desionizada a 4°C, até serem usados.

2. Local do Estudo

O estudo decorreu no Laboratório de Biomateriais e no Laboratório de Morfologia do Instituto Universitário Egas Moniz, bem como na Clínica Dentária Universitária Egas Moniz.

3. Tipo de Estudo e Seleção da Amostra

Atendendo aos critérios de inclusão, apenas se selecionaram dentes íntegros, não cariados, livres de fraturas e sem alterações de superfícies expostas a tratamentos químicos ou mecânicos, à exceção dos contemplados na higiene dentária dos indivíduos.

Enfatizando os critérios de exclusão, estes abrangem dentes com malformações, que não estejam íntegros, que tenham sido submetidos a tratamentos químicos (branqueamento, entre outros), mecânicos (tratamento ortodôntico prévio ou outros) ou eletromagnéticos (radiação laser).

Foi realizado um estudo *ex-vivo* experimental e analítico em 13 molares humanos hígidos, sem cáries e sem fraturas, obtidos de sujeitos anónimos, que cumpriram os critérios supramencionados.

A partir dos 13 dentes, obtiveram-se 39 fragmentos de esmalte de 20 μm . Os 13 dentes foram aleatoriamente distribuídos em 3 grupos de estudo e 2 de controlo, respetivamente: Grupo A (n=3); Grupo B (n=3); Grupo C (n=3); Grupo D⁺ (n=2), controlo positivo e Grupo D⁻ (n=2), controlo negativo. Estes grupos foram sujeitos a desmineralização e posteriormente foram submetidos a diferentes protocolos de remineralização ou estabilização de esmalte. Ao grupo D (n=4), grupo de controlo, não foi aplicado nenhum agente de remineralização ou estabilização de esmalte.

Não obstante, todas as 13 amostras foram submetidas a três radiovisiografias: antes da indução das WSL, depois da indução das WSL e depois da aplicação do agente de remineralização ou estabilização de esmalte.

Todas as amostras foram submetidas à análise qualitativa de observação com recurso a microscopia ótica através da 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, para caracterização do esmalte convalidando a observação ótica, com a observação histológica e radiográfica, do esmalte.

4. Preparação e Identificação das Amostras

Depois de selecionada a amostra, procedeu-se à limpeza dos dentes com recurso a curetas de Gracey manuais, com o objetivo de eliminar restos de tecidos, como o ligamento periodontal e tártaro (Cardoso *et al.*, 2016). De seguida, as amostras foram colocadas numa solução contendo cloramina tri-hidratada a 1% durante 7 dias à temperatura de 4°C, sendo depois, colocadas em água desionizada até ao seu uso (Perdigão, 2019).

Para facilitar a observação histológica quanto à proveniência do corte observado, procedeu-se à identificação das amostras, na face oclusal, dividindo-a em três regiões: a região mesial (cor azul), a região central (cor verde) e a região distal (cor-de-rosa) em cada amostra, tal como ilustrado na figura. 2.

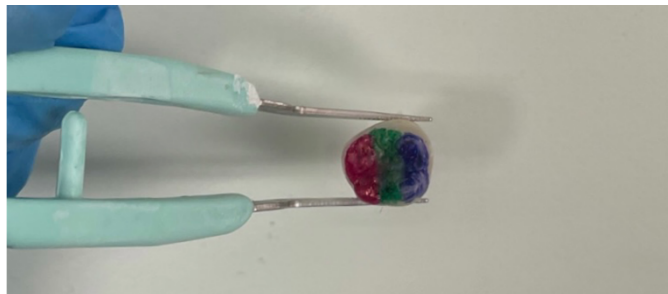


Figura 2. Identificação das amostras na face oclusal.

5. Aleatorização das amostras

Após a preparação e a identificação das amostras e antes de ser tirada a primeira radiovisiografia, os 13 dentes foram aleatoriamente divididos em cinco grupos de estudo: Grupo A (n=3), Grupo B (n=3), Grupo C (n=3) e Grupo D (n=4), que se subdividiu em Grupo D⁺ (n=2) e Grupo D⁻ (n=2). O Grupo D (n=4) representa o grupo controlo, apresentando um controlo positivo (D⁺) e um controlo negativo (D⁻). Submeteu-se cada amostra a três radiovisiografias: antes da indução das WSL, depois da indução das WSL e depois da aplicação do agente de remineralização comercial e/ou da resina infiltrante.

Após a indução das WSL, procedeu-se à remineralização com recurso ao CPP-ACP das amostras do grupo A e B e à estabilização do esmalte com ICON®, das amostras do grupo B e C.

Os três grupos de estudo (A, B e C), durante e entre todos os ciclos de remineralização/estabilização, foram colocados em saliva artificial. No grupo D, os espécimes ficaram armazenados em saliva artificial, no grupo D⁺, e em água desionizada no grupo D⁻, durante as 4 semanas nas quais o estudo decorreu.

6. Grupos de estudo

Grupo A (n=3) - Grupo de Estudo

Os 3 espécimes foram remineralizados com CPP-ACP (GC *Tooth Mousse*, *Recaldent*TM, GC Europe, lote: 201020C, validade: 04/2023) com o auxílio de uma *microbrush*, durante 3 minutos, uma vez por dia, durante 4 semanas, seguida de imersão em saliva artificial, mudada a cada aplicação. Foram armazenados na estufa (Memmert INE 400, Memmert, Germany) a 37°C. De seguida, as amostras foram seccionadas, obtendo-se 3 espécimes, de cada amostra, que foram visualizados ao microscópio ótico.

Grupo B (n=3) - Grupo de Estudo

Os 3 espécimes foram remineralizados com CPP-ACP (GC *Tooth Mousse*, *Recaldent*TM, GC Europe, lote: 201020C, validade: 04/2023) com o auxílio de uma *microbrush*, durante 3 minutos, uma vez por dia, durante 4 semanas, seguida de imersão em saliva artificial, mudada a cada aplicação. Foram armazenados na estufa (Memmert

INE 400, Memmert, Germany) a 37°C. Após estas 4 semanas foi aplicado a resina infiltrante ICON®, mais especificamente o *Icon Caries Infiltrant – Smooth Surface®* (DMG America Company, Hamburgo, Alemanha, lote: 230057, validade: 11/2022) segundo o seguinte protocolo fornecido pelo fabricante:

- 1) Limpeza da superfície;
- 2) Aplicação do *Icon-Etch®* (ácido hidroclorídrico, ácido silícico pirogénico e substâncias de reação ativa com a superfície) através da sua seringa na superfície a ser tratada, durante 2 minutos, fazendo movimentos circulares;
- 3) Lavar com água durante 30s e secar com ar;
- 4) Aplicar o *Icon-Dry®* (Etanol a 99%) durante 30s;
- 5) Secar a superfície;
- 6) Colocar uma ponta (*Smooth Surface-Tip*, DMG America Company, Hamburgo, Alemanha) na seringa do *Icon-Infiltrant®* e aplicar o produto na superfície do esmalte. Esperar 3 minutos para a resina infiltrar. Ativar o infiltrante através de movimentos circulares;
- 7) Fotopolimerizar durante 40s;
- 8) Repetir a aplicação da resina durante 1 minuto;
- 9) Fotopolimerizar durante 40s.

De seguida, as amostras foram seccionadas, obtendo-se 3 espécimes, de cada amostra, que foram visualizados ao microscópio ótico.

Grupo C (n=3) - Grupo de Estudo

Os 3 espécimes foram imersos em saliva artificial durante 4 semanas a 37°C, tempo após o qual se procedeu à estabilização do esmalte com ICON® (DMG, Alemanha), segundo o protocolo supramencionado. De seguida, as amostras foram seccionadas, obtendo-se 3 espécimes, de cada amostra, que foram visualizados ao microscópio ótico.

Grupo D⁺ (n=2) – Grupo controlo

Aos 2 espécimes de esmalte são, foram induzidas lesões artificiais de cárie dentária durante 6 dias, sendo depois armazenados em saliva artificial durante 4 semanas, a 37°C. De seguida, as amostras foram seccionadas, obtendo-se 3 espécimes, de cada amostra, que foram visualizados ao microscópio ótico.

Grupo D⁻ (n=2) – Grupo controlo

Aos 2 espécimes de esmalte são, foram induzidas lesões artificiais de cárie dentária durante 6 dias, sendo depois armazenados em água desionizada durante 4 semanas, a 37°C. De seguida, as amostras foram seccionadas, obtendo-se 3 espécimes, de cada amostra, que foram visualizados ao microscópio ótico.

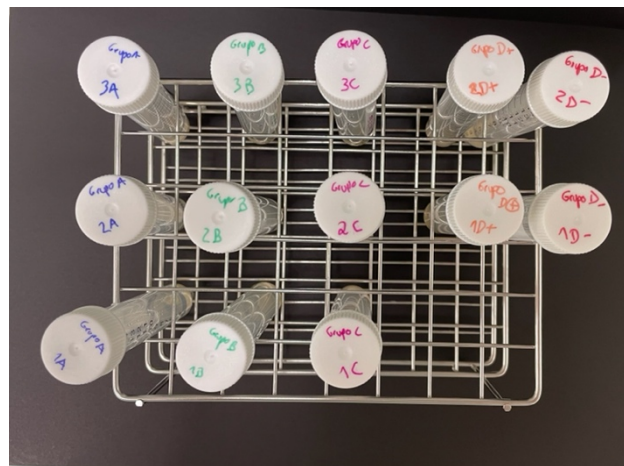


Figura 3. Grupos de estudo e de controlo categorizados.

7. Procedimento Radiovisiografia Digital

Todas as amostras foram submetidas à máquina de radiovisiografia digital da Clínica Universitária Egas Moniz, Care-Stream Dental 2100 (CareStream, Atlanta, Estados Unidos da América) (Fig.2) com 60 kV, com uma distância ampola-cone de 15 cm, e durante 0,06 s (Vaswani *et al.*, 2018), antes de serem submetidas ao ataque ácido

para simular as WSL, ou seja, com as amostras sãs e híginas, depois de serem induzidas as WSL e depois do ciclo remineralizador/estabilizador, após 4 semanas.

De modo a manter o mesmo contraste e brilho, todas as radiovisiografias foram captadas com a mesma radiação, com as amostras em igual posição (com a face vestibular para cima) e com uma distância ampola-cone padronizada, de modo a reduzir o envies do método (Vaswani *et al.*, 2018).



Figura 4. Máquina de Radiovisiografia.

8. Procedimento Indução das lesões de Cárie Artificiais (*White-Spots*)

Todos os grupos sofreram um processo de desmineralização, simulando lesões artificiais de cárie dentária, nomeadamente *white-spots*, e estas foram obtidas com recurso a uma solução de 50 mM de ácido láctico (3mM CaCl₂.H₂O, 6μM de tetra etil metil difosfonato, 3mM KH₂PO₄ e vestígios de timol) com pH 5, durante 6 dias (Fig. 5) (Buskes *et al.*, 1985).

Os espécimes foram conservados numa estufa, a 37°C (Memmert INE 400, Memmert, Alemanha) (Yadav *et al.*, 2019).

A escolha do ácido láctico para a criação de lesões de cárie, prende-se com o facto de que este ácido se constitui como um dos principais ácidos, resultantes da fermentação

dos hidratos de carbono, provenientes da dieta, produzidos pelos *Streptococcus mutans* e pelos *Lactobacillus spp*, sendo estas últimas, bactérias cariogénicas associadas a lesões de cárie do tipo WSL (Pitts *et al.*, 2018). A solução foi diariamente renovada (Elkassas & Arafa, 2014).



Figura 5. Solução de Ácido Láctico.

9. Procedimento Saliva Artificial

A cada tratamento, todas as amostras foram colocadas numa solução de saliva artificial (1000 mL), tendo por base os postulados de Urban e colaboradores, em 2009. Esta solução apresentava um pH de 7 e era constituída por: 5,36 mM de KCl (Cloreto de Potássio), 6,84mM de NaCl (Cloreto de Sódio), 1,36 mM de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (cloreto de cálcio dihidratado) 2,11mM de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Di-hidrogenofosfato de sódio monohidratado), 64,07 μM de $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ (sulfito de sódio nano-hidratado), 16,65mM de Ureia (CON_2H_4), 2,89mM de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (hidrogénofosfato de sódio dihidratado) e água destilada ultra-pura até atingir os 1000 mL (Fig.6).



Figura 6. Solução de saliva artificial.

10. Procedimento de Remineralização das *White-spot lesions* e de estabilização do esmalte: Aplicação de CPP-ACP e ICON®

Os espécimes dos grupos A e B foram submetidos ao tratamento com o agente CPP-ACP (GC *Tooth Mousse*, *Recaldent*TM, GC Europe, lote: 201020C, validade: 04/2023) (Fig.7). Com o auxílio de uma *microbrush*, aplicou-se a pasta de CPP-ACP, uma vez por dia, sobre a superfície do esmalte de cada um dos espécimes dos grupos A e B, durante 3 minutos, segundo as instruções do fabricante, como observado na figura 8, lavando-se depois com água desionizada para remover os excessos (Gulec & Goymen, 2019).



Figura 7. *GC Tooth Mousse Recaldent*TM: Pasta de CPP-ACP.

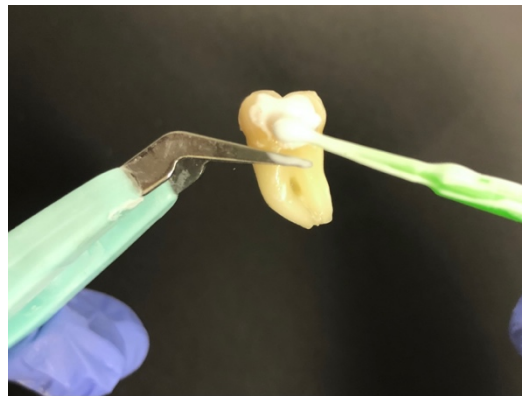


Figura 8. Aplicação do *GC Tooth Mousse*.

O esmalte dos espécimes do grupo B e C foi estabilizado, com o recurso à resina infiltrante Icon® (DMG America Company, Hamburgo, Alemanha, lote: 230057, validade: 11/2022), aplicada na superfície do esmalte (Fig.10). Este *kit*, é composto por 3 seringas, o *Icon-Etch* (Ácido Clorídrico a 15%), o *Icon-Dry* (etanol a 99%) e o *Icon Infiltrant* (matriz de resina tendo por base metacrilato, trietilenglicol dimetacrilato (TEGDMA), com iniciadores e aditivos) (Fig.9) (Perdigão, 2019).

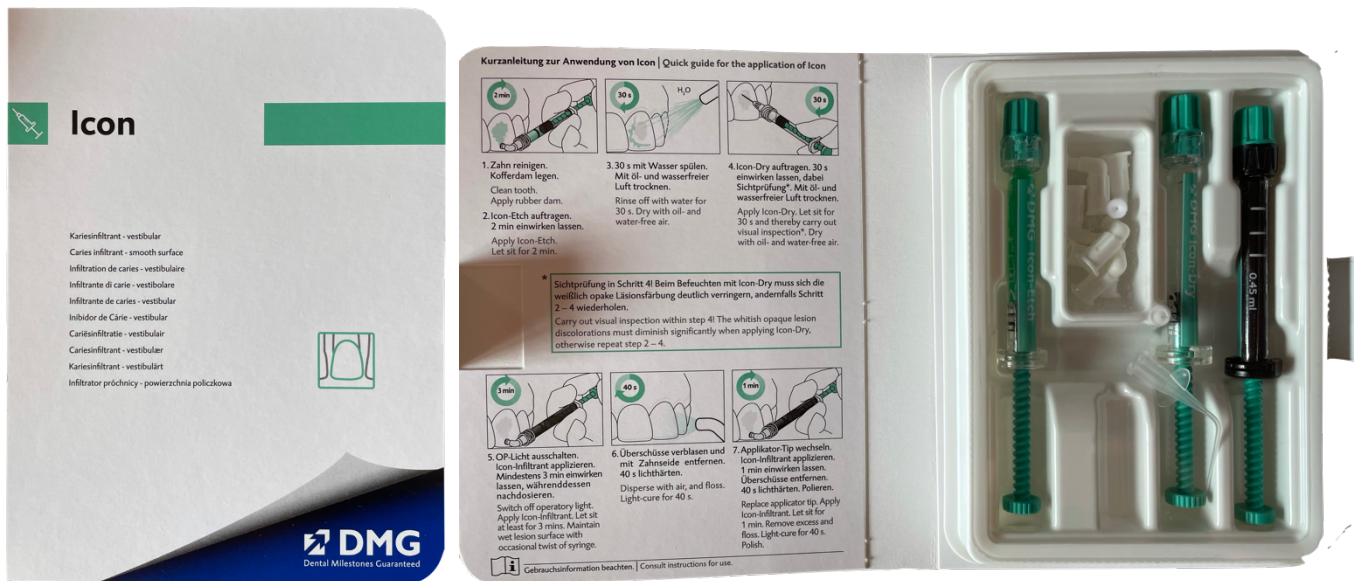


Figura 9. Kit de Resina Infiltrante ICON® para superfícies vestibulares

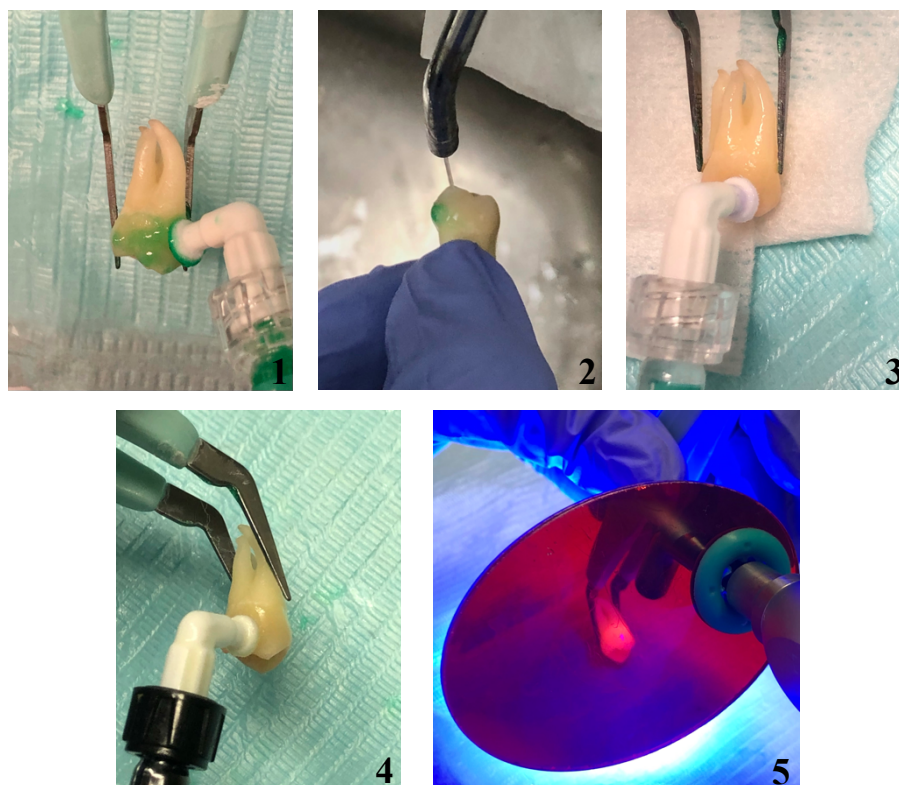


Figura 10. Esquematização das etapas laboratoriais para a aplicação da resina infiltrante ICON®. 1) Condicionamento ácido com *Icon-Etch* durante 2 minutos; 2) Aspiração, lavagem e secagem; 3) Aplicação do *Icon-Dry* durante 30 segundos e secar com ar; 4) Infiltração da lesão com *Icon-Infiltrant* durante 3 minutos; 5) Remover os excessos com algodão e Fotopolimerização durante 40 segundos; Repetir o passo (4) durante 1 minuto e voltar a repetir o passo (5).

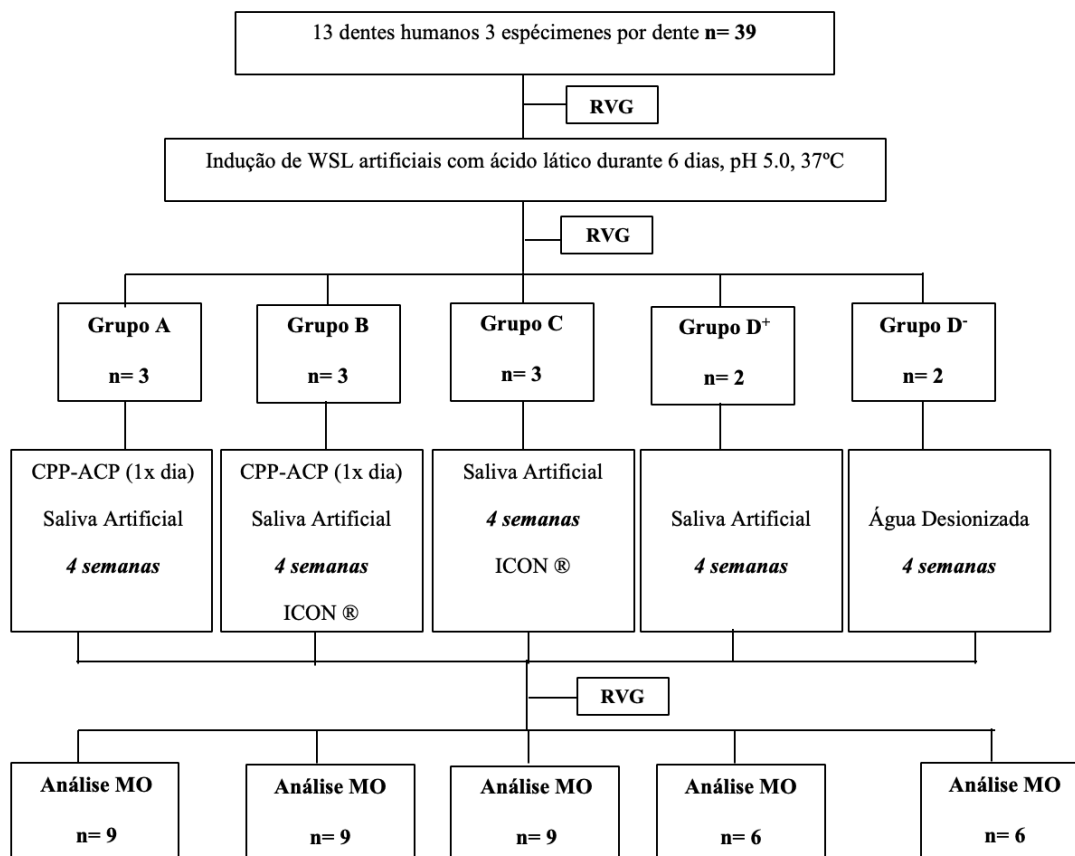


Figura 11. Fluxograma do protocolo laboratorial.

11. Procedimento da Análise Histológica das Amostras ao Microscópio Ótico

A pertinência do estudo em si, prende-se com o facto de que a microscopia eletrónica costuma ser a técnica de eleição para a análise histológica das lesões de cárie; no entanto, neste estudo decidiu usar-se a microscopia ótica como peça fundamental no diagnóstico das lesões de cárie, uma vez que é uma técnica pouco documentada.

Para a visualização de um tecido ao microscópio, este necessita de ser processado de acordo com cinco etapas, sendo elas: a fixação, o processamento, a inclusão, o corte em micrótomo e a coloração (Bancroft *et al.*, 2019). O processamento clássico, encontra-se subdividido em: desidratação, clarificação, infiltração e impregnação (Bancroft *et al.*, 2019).

De um modo resumido, a fixação previne a autólise e estabiliza a arquitetura tecidular, a desidratação remove a água dos tecidos, a clarificação permite a remoção completa dos agentes de desidratação, tornando o tecido recetivo aos agentes de

infiltração, a infiltração recorre a agentes que penetram no tecido para lhe dar suporte e por último, a impregnação, onde há a orientação da amostra no meio de suporte, torna a amostra apta para o corte com o micrótomo (Bancroft *et al.*, 2019). O objetivo do processamento prende-se com a difusão dos reagentes para o interior dos tecidos, tornando os fragmentos rígidos e aptos para o corte com o micrótomo, obtendo-se fatias finas e delicadas das amostras (Bancroft *et al.*, 2019).

Nesta investigação, o processamento das amostras foi um pouco diferente, uma vez que a técnica está muito pouco documentada para o estudo do esmalte, tentámos primeiro processar as amostras como se processa o tecido ósseo, saltando a etapa da descalcificação, no entanto, após várias tentativas não obtivemos resultados satisfatórios, pelo que preconizamos em primeiro lugar o corte das amostras no micrótomo e depois o seu processamento, o que veio a revelar-se a melhor opção.

11.1 Corte das Amostras

O primeiro passo foi a secção das nossas amostras com recurso a um micrótomo de tecidos duros que se encontra no laboratório de Biomateriais, mais especificamente o Accutom 50 (Struers® A/S, Ballerup, Dinamarca). Para iniciar os cortes, as amostras foram coladas, com cera colante (Sticky Wax, Kemdent®, Wiltshire, Inglaterra), a um suporte de metacrilato.

No processamento histológico normal usaríamos parafina ou resina para a infiltração, para posterior corte no micrótomo (Bancroft *et al.*, 2019); no entanto, materiais extremamente duros, como o esmalte dentário requerem outro tipo de processamento e técnica; no entanto, a dentina permite a infiltração da resina (Bancroft *et al.*, 2019). A infiltração com a resina depende da densidade e do tamanho da amostra podendo demorar dias (Bancroft *et al.*, 2019); como tal optou-se por usar cera colante, que não requer polimerização, para dar suporte ao dente e obter um corte fino e sem estrias do disco. Acresce o facto de o esmalte não possuir uma estrutura tubular como a dentina, dificultando ainda mais o processo de infiltração.

Posto isto, iniciaram-se os vários cortes. O 1º corte foi no sentido vestibulolingual, ao nível do terço médio da raiz, de modo a separar as mesmas do resto do dente. O 2º corte foi no sentido mesio-distal, onde obtivemos um corte fino de esmalte. De seguida,

fizeram-se mais dois cortes iguais ao último, culminando com a obtenção de três espécimes para cada dente, perfazendo um total de 39 espécimes (n=39).



Figura 12. Micrótopo de tecidos duros Accutom 50 (Struers).

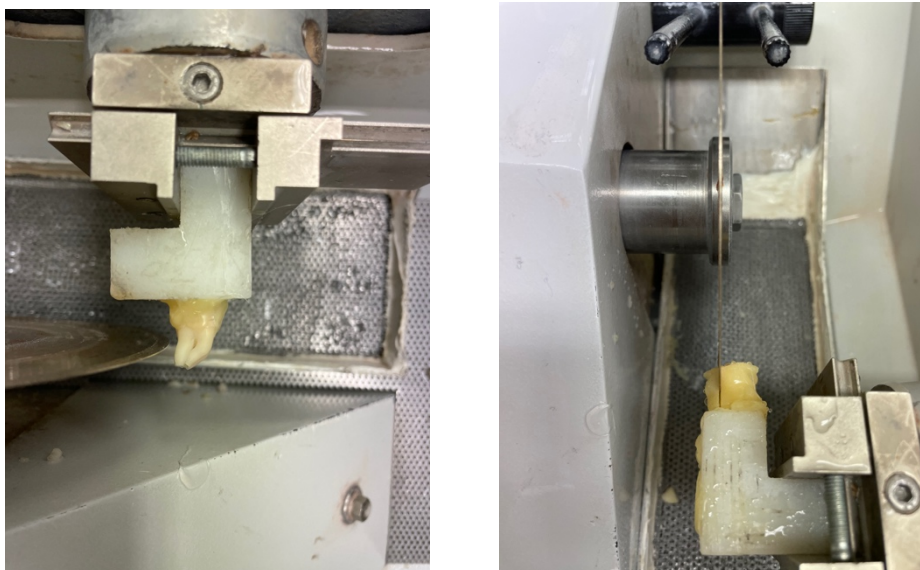


Figura 13. Corte vestibulolingual (à esquerda); Corte méso-distal (à direita).



Figura 14. Amostra envolta em cera colante.

11.2 Polimento das Amostras

Os fragmentos foram polidos com recurso à máquina polidora LaboPol- 4® (WS Struers 18-B, Dinamarca), usando para tal efeito várias lixas de granulação com diferente granulometria entre si: 320, 600 e 1200 grits (Buehler, Lake Bluff, IL, USA). Todas elas foram usadas de um modo sequencial, a uma velocidade de 40 rpm, com recurso a um sistema de refrigeração de modo a prevenir qualquer sobreaquecimento gerado (Ionta *et al.*, 2014). Este polimento teve como objetivo a remoção de qualquer resíduo deixado pela lâmina, além de que, como supramencionado, o processamento de dentes acaba por possuir diferentes etapas, preconizando-se o polimento dos cortes para adquirir a espessura desejada, tornando a amostra mais homogénea, facilitando a montagem das lâminas (Petrone & Garizoain, 2017).

Após o polimento obtiveram-se amostras com uma espessura de 20 μm , o que nos pareceu uma espessura razoável (Fig. 16).

Após o polimento, as amostras foram lavadas com água destilada, por forma a remover quaisquer detritos deixados, sendo o excesso de água retirado com papel absorvente, evitando contacto direto com as superfícies a ser observadas (Petrone & Garizoain, 2017).

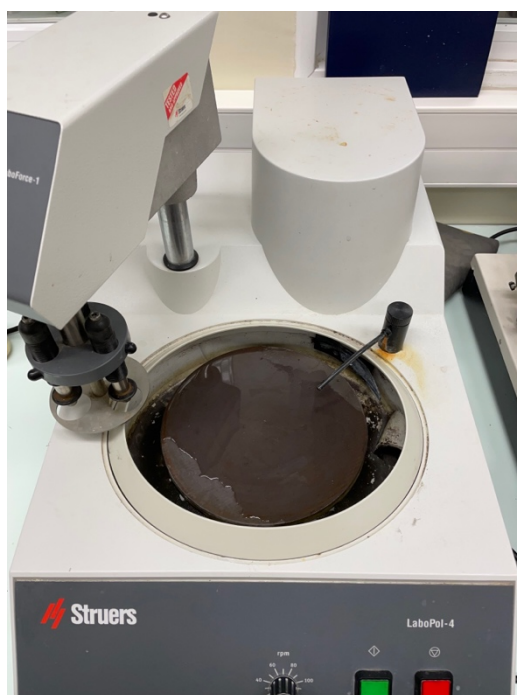


Figura 15. Máquina polidora LaboPol- 4® (WS Struers 18-B, Dinamarca).



Figura 16. Medição da espessura da amostra com recurso a cravira.

11.3. Processamento e montagem das amostras histológicas

O processamento das nossas amostras foi diferente do usual, dividindo-se apenas em duas etapas: a clarificação e a impregnação, com conseqüente montagem das lâminas.

A montagem das lâminas histológicas é definida como a colocação da amostra numa lâmina de vidro, onde há a colocação de uma substância em conjunto com o material histológico, de modo a preservá-lo e a facilitar a união da lâmina com a lamela (Paiva *et al.*, 2006).

Para a clarificação, fez-se uso do Xilol (Fig.17), que é um solvente que se destina a remover completamente a água e gordura existentes na amostra, tornando-as mais claras e transparentes (Amendoeira *et al.*, 2010; Bancroft *et al.*, 2019).

Por sua vez, para a impregnação das amostras recorreu-se ao *Entellan* (Fig.17) que consiste numa resina sintética usada para a montagem de lâminas histológicas, uma vez que possui boas características de secagem e transparência das amostras, bem como é reconhecido por preservar o material histológico em boas condições de visualização por um tempo indeterminado (Paiva *et al.*, 2006). É, igualmente um meio de montagem hidrofóbico e permanente (Amendoeira *et al.*, 2010).

Com a impregnação, pretende-se eliminar completamente o xilol contido nas amostras, permitindo a penetração do *Entellan* nas amostras histológicas (Bancroft *et al.*, 2019). Este passo, permite também endurecer as amostras (Bancroft *et al.*, 2019).

As nossas amostras foram então imersas em xilol (Fig.18), e retiradas logo de seguida, uma vez que a imersão prolongada em xilol resseca o material, interferindo na qualidade do mesmo (Amendoeira *et al.*, 2010). De seguida, com recurso a uma pipeta, colocou-se *Entellan* na lâmina, de seguida colocou-se a amostra e depois a lamela por cima (Fig.19). O tempo de secagem das amostras foi de 24 horas (Paiva *et al.*, 2006).

É importante salientar, que para uma correta análise histológica de qualquer amostra, é fulcral que a lâmina seja bem preparada, influenciado a sua montagem, a interpretação e discussão de resultados (Paiva *et al.*, 2006).



Figura 17. Xilol (Esquerda) e Entellan (Direita).



Figura 18. Amostra imersa em Xilol.

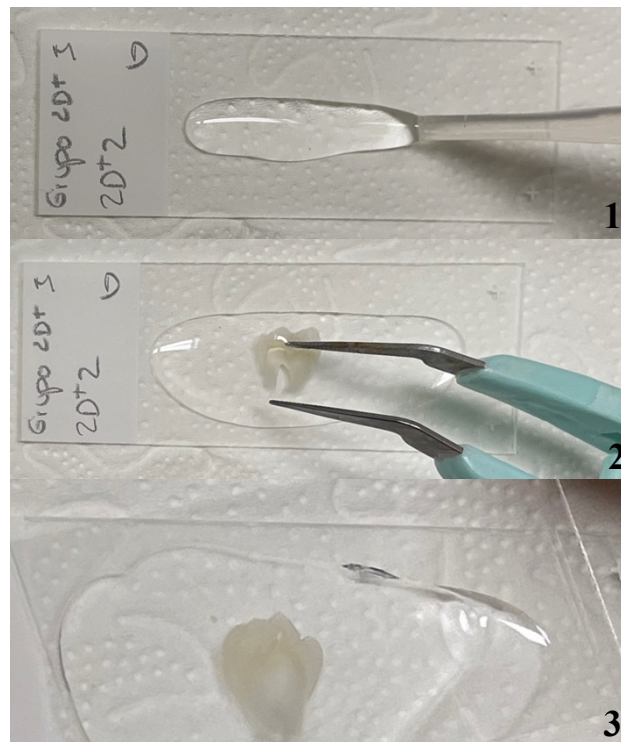


Figura 19. Sequência laboratorial da montagem das lâminas histológicas. 1) Colocação de *Entellan* na lâmina com recurso a uma pipeta; 2) Colocação da amostra na lâmina; 3) Colocação da lamela por cima da amostra.

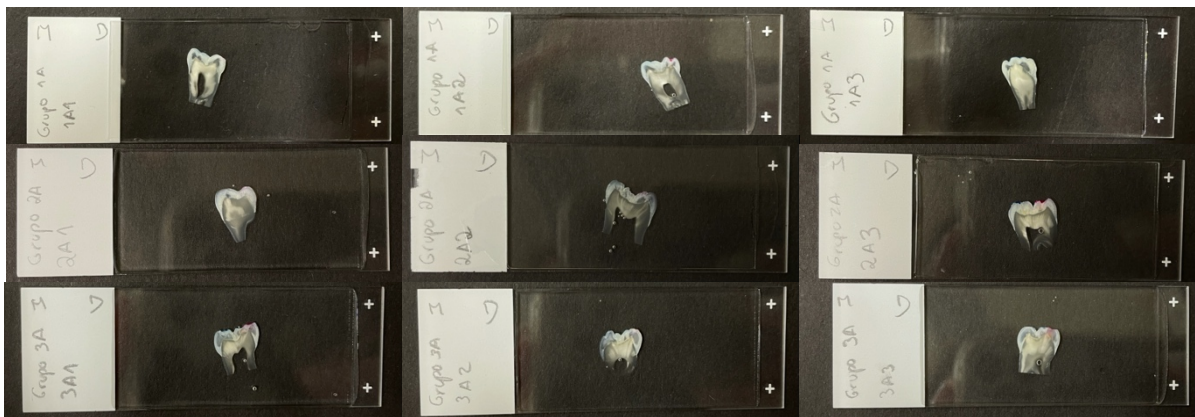


Figura 20. Lâminas do grupo A

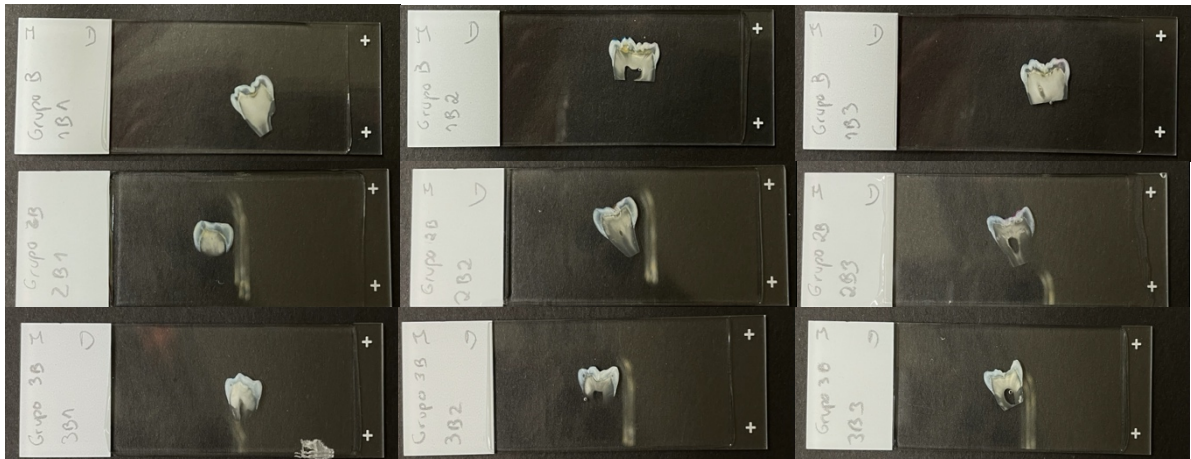


Figura 21. Lâminas do grupo B

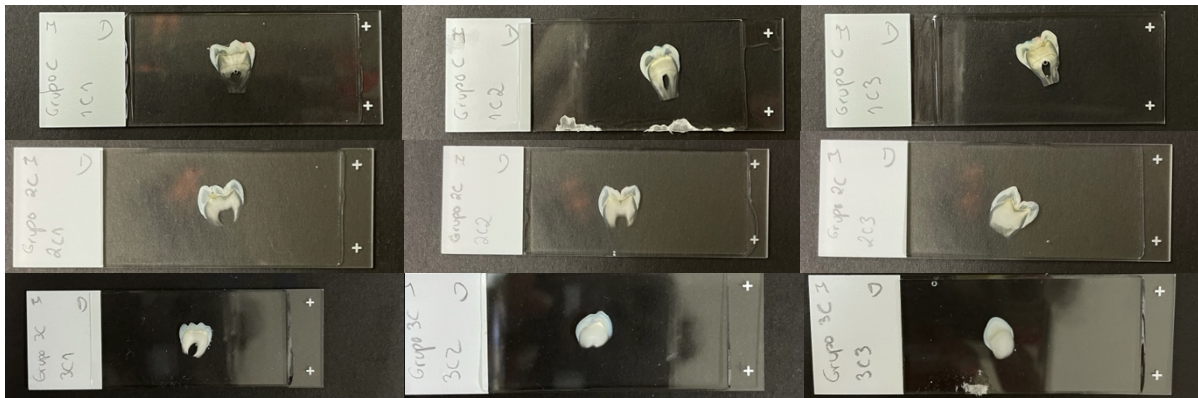


Figura 22. Lâminas do grupo C

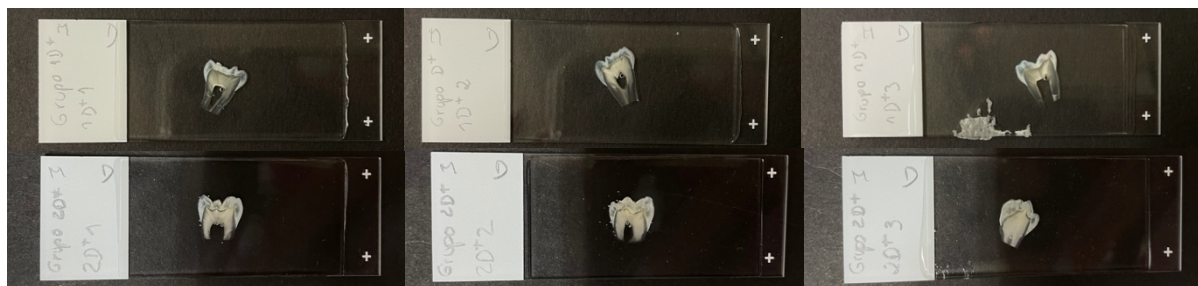


Figura 23. Lâminas do grupo D⁺

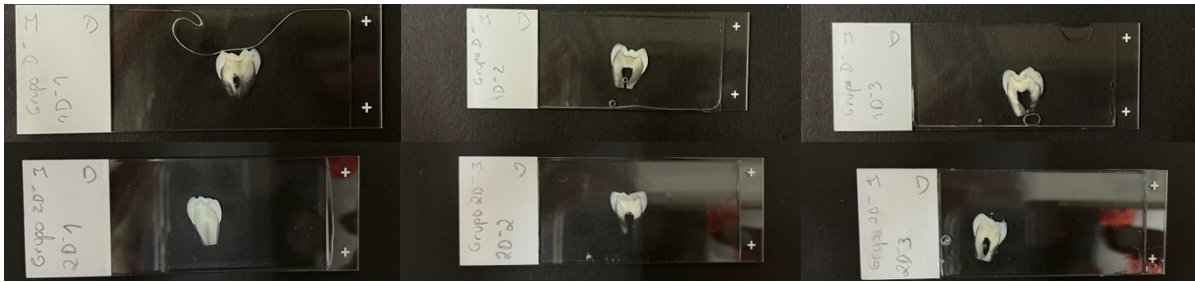


Figura 24. Lâminas do grupo D

11.4 Microscopia Ótica (MO)

Recorreu-se ao Microscópio ótico, através da lupa esteromicroscópica Leica™ MZ6 (Leica, Germany) com uma câmara Leica™ DFC (20X), aplicando o software Leica Application Suite versão 3.5.0, para analisar os 3 espécimes por dente.



Figura 25. Microscópio ótico.

12. Análise Qualitativa

Relativamente às amostras, estas foram analisadas qualitativamente de acordo com a presença ou não de agentes remineralizadores ou estabilizadores de esmalte.

IV. RESULTADOS

1. Radiovisiografia

Cada espécime foi submetido a três radiovisiografias: antes da indução de cárie, depois da indução de cárie e após a remineralização/estabilização.

Os resultados encontram-se na tabela 3.

Tabela 3. Radiovisiografias dos espécimes dos grupos A, B, C e D.

		Amostras												
		1A	2A	3A	1B	2B	3B	1C	2C	3C	1D ⁺	2D ⁺	1D ⁻	2D ⁻
Antes da indução de cárie														
Depois da indução de cárie														
Depois da remineralização/estabilização do esmalte														

2. Microscópio Ótico (MO): Análise Histológica Qualitativa

Observaram-se três espécimes por dente, com três ampliações diferentes: x4, x10 e x40. Os espécimes foram analisados em quatro zonas distintas: mesio-cervical, na zona coronária mesial, na zona coronária distal e a disto-cervical, nas quais não se evidenciaram diferenças significativas entre as zonas cervicais, a mesial e a distal, bem como não há diferenças entre a zona coronária mesial e distal; no entanto, há diferenças entre as zonas cervicais quando comparadas com as zonas coronárias e vice-versa, como demonstrado ao longo das figuras 26-30, a título de validação ótica.

As figuras 31 a 42 representam as imagens que foram selecionadas para análise.

Grupo A

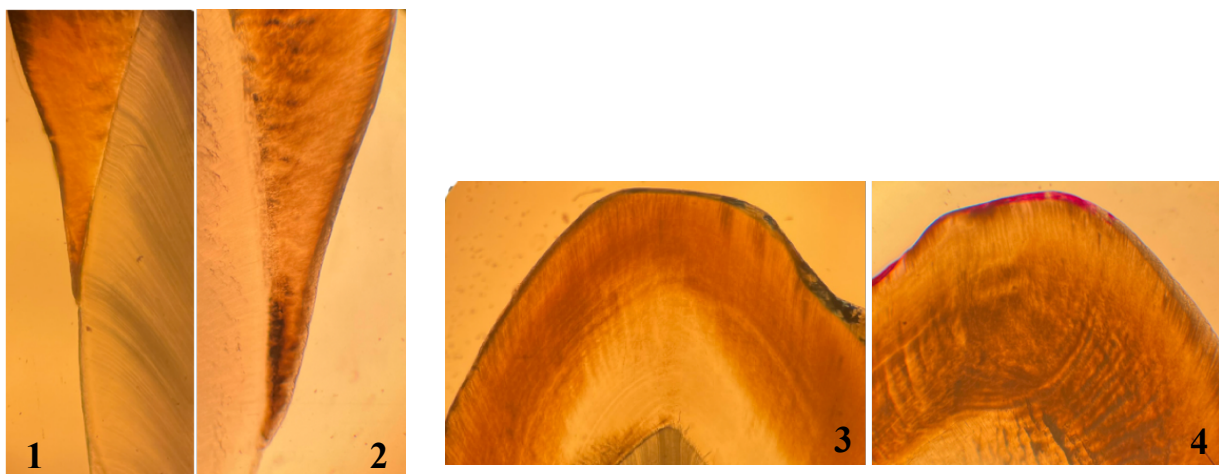


Figura 26. Fotomicrografia de corte transversal de quatro espécimes do grupo A na zona mesio-cervical (1), disto-cervical (2) e na zona coronária mesial (3) e distal (4) (Magnificação x4). Observa-se o 1º corte da amostra 1 (1) e o 3º corte da amostra 2 (2), onde não se evidenciam diferenças entre ambas as localizações. À direita encontramos o 2º corte da amostra 1 (3) e o 1º corte da amostra 2 onde também não se assinalam diferenças entre si.

Grupo B

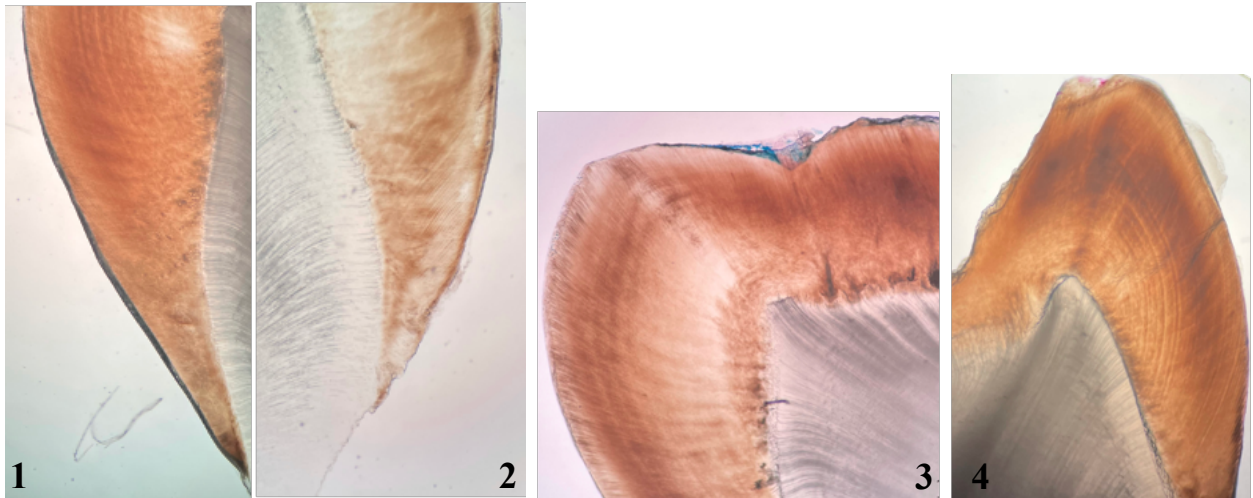


Figura 27. Fotomicrografia de corte transversal de quatro espécimes do grupo B na zona mesio-cervical (1), disto-cervical (2) e na zona coronária mesial (3) e distal (4) (Magnificação x4). Observa-se o 1º corte da amostra 3 (1) e o 3º corte da amostra 2 (2), onde não se evidenciam diferenças entre ambas as localizações. À direita encontramos o 2º corte da amostra 2 (3) e o 3º corte da amostra 3 onde também não se assinalam diferenças entre si.

Grupo C

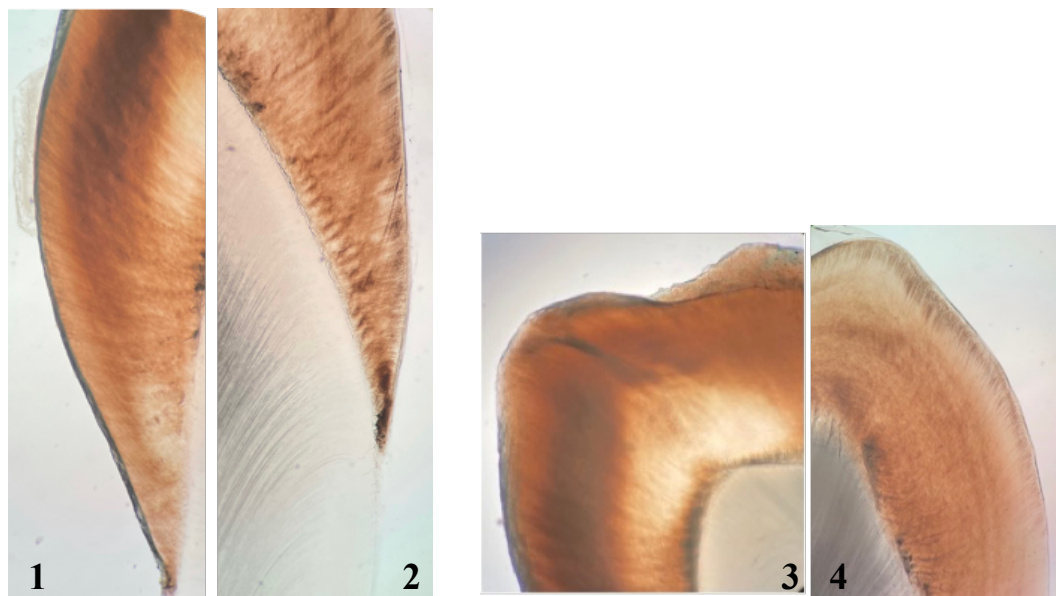


Figura 28. Fotomicrografia de corte transversal de quatro espécimes do grupo C na zona mesio-cervical (1), disto-cervical (2) e na zona coronária mesial (3) e distal (4) (Magnificação x4). Observa-se o 1º corte da amostra 1 (1) e o 1º corte da amostra 2 (2), onde não se evidenciam diferenças entre ambas as localizações. À direita encontramos o 3º corte da amostra 1 (3) e o 2º corte da amostra 3 onde também não se assinalam diferenças entre si.

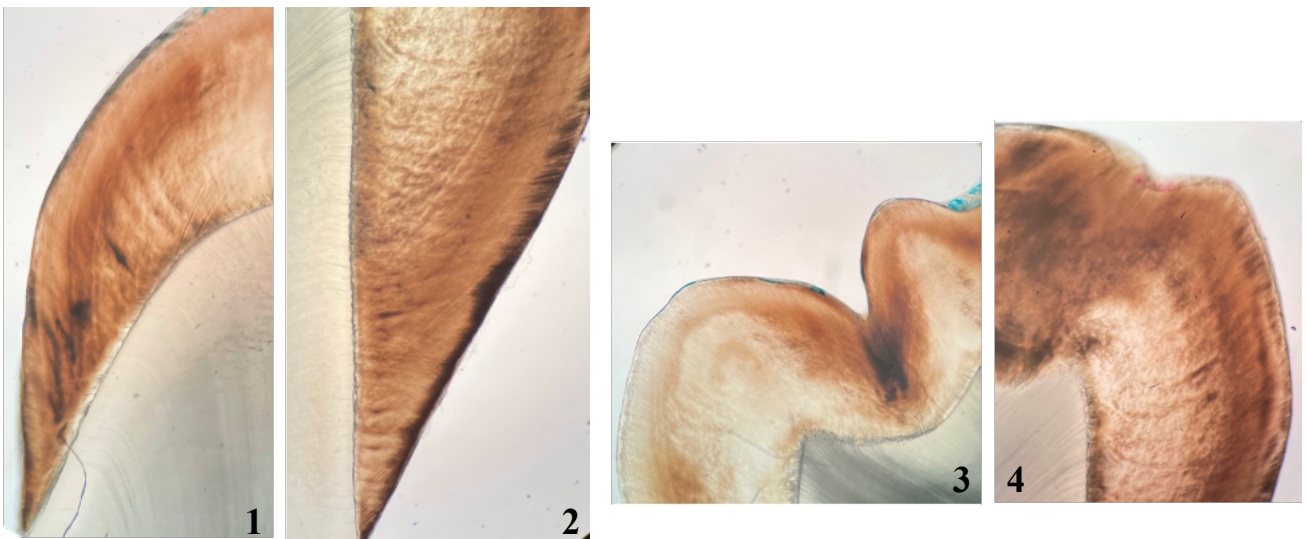
Grupo D⁺ (Controlo Positivo)

Figura 29. Fotomicrografia de corte transversal de quatro espécimes do grupo D⁺ na zona mesio-cervical (1), disto-cervical (2) e na zona coronária mesial (3) e distal (4) (Magnificação x4). Observa-se o 1^o corte da amostra 1 (1) e o 1^o corte da amostra 2 (2), onde não se evidenciam diferenças entre ambas as localizações. À direita encontramos o 2^o corte da amostra 1 (3) e o 1^o corte da amostra 2 onde também não se assinalam diferenças entre si.

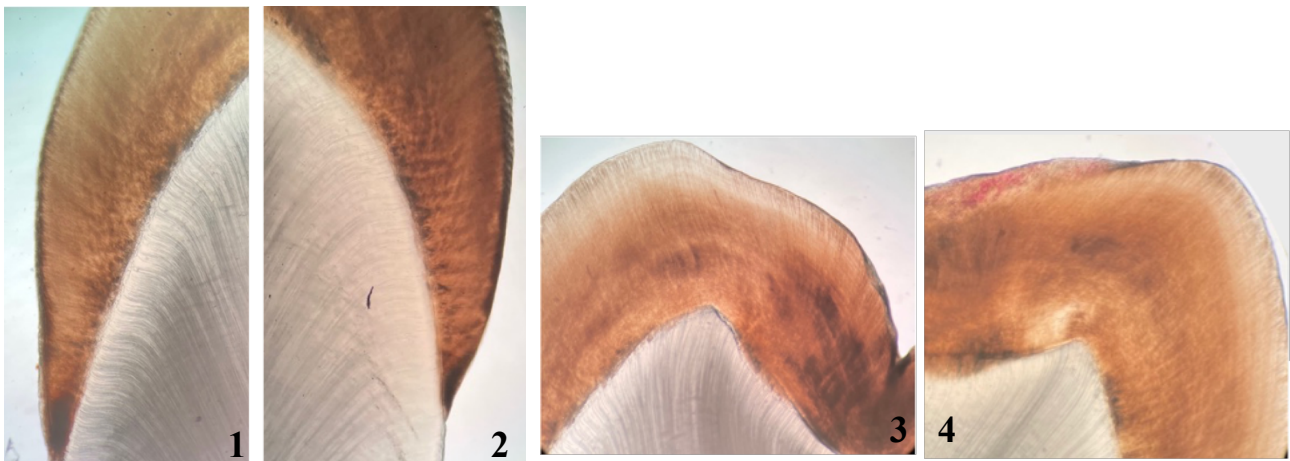
Grupo D⁻ (Controlo Negativo)

Figura 30. Fotomicrografia de corte transversal de quatro espécimes do grupo D⁻ na zona mesio-cervical (1), disto-cervical (2) e na zona coronária mesial (3) e distal (4) (Magnificação x4). Observa-se o 2^o corte da amostra 1 (1) e o 1^o corte da amostra 2 (2), onde não se evidenciam diferenças entre ambas as localizações. À direita encontramos o 2^o corte da amostra 1 (3) e o 2^o corte da amostra 2 onde também não se assinalam diferenças entre si.

Grupo A

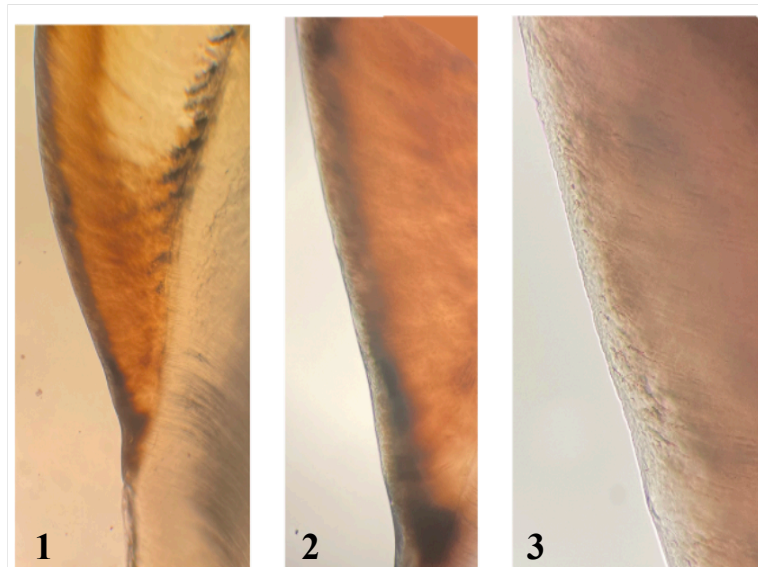


Figura 31. Fotomicrografia de corte transversal, na zona mesio-cervical do esmalte (Magnificação x4 (1), x10 (2) e x40 (3)), após indução de lesão artificial de *white-spot* e aplicação de pasta de CPP-ACP. Observa-se, nas três replicadas uma homogeneidade nos prismas de esmalte, onde há um preenchimento das lacunas por depósitos minerais da pasta CPP-ACP.

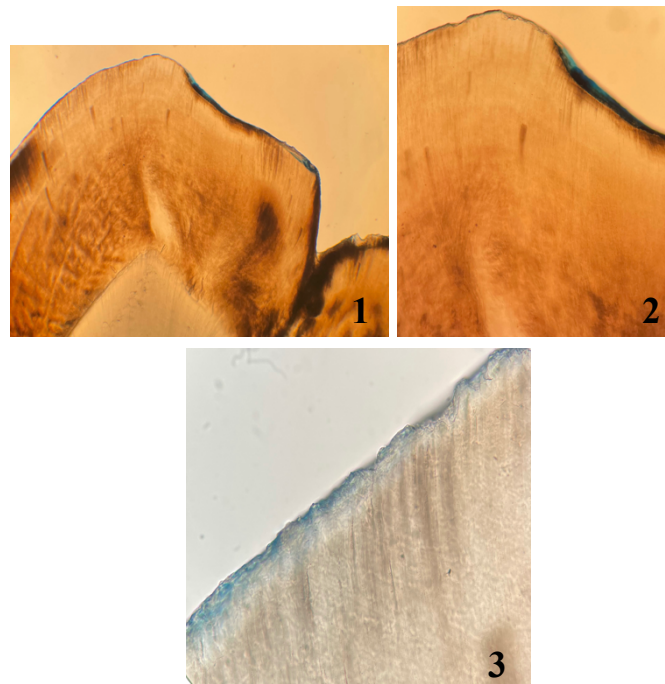


Figura 32. Fotomicrografia de corte transversal, na zona coronária mesial do esmalte (Magnificação x4 (1), x10 (2) e x40 (3)), após indução de lesão artificial de *white-spot* e aplicação de pasta de CPP-ACP. Observa-se, nas três replicadas uma mancha homogênea ao longo das Bandas de Hunter Schreger onde há um preenchimento das lacunas por depósitos minerais da pasta CPP-ACP.

Grupo B

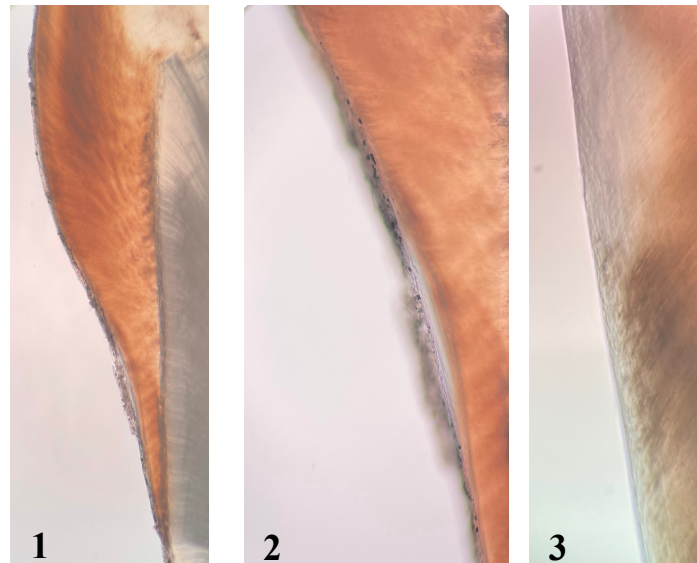


Figura 33. Fotomicrografia de corte transversal, na zona mesio-cervical do esmalte (Magnificação x4 (1), x10 (2) e x40 (3)), após indução de lesão artificial de *white-spot* e aplicação de pasta de CPP-ACP e posteriormente de resina infiltrante ICON®. Observa-se, nas três replicadas uma homogeneidade nos prismas de esmalte, onde há um preenchimento das lacunas por depósitos minerais da pasta CPP-ACP.

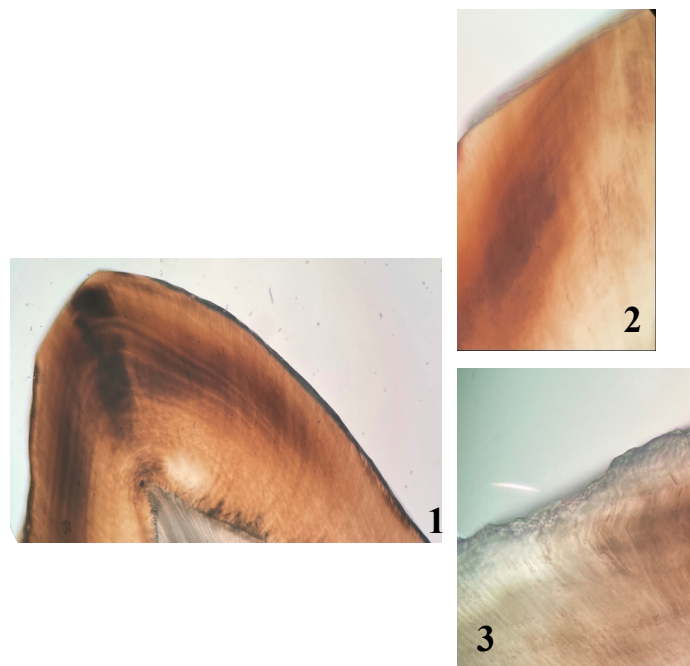


Figura 34. Fotomicrografia de corte transversal, na zona coronária distal do esmalte (Magnificação x4 (1), x10 (2) e x40 (3)), após indução de lesão artificial de *white-spot* e aplicação de pasta de CPP-ACP e posteriormente de resina infiltrante ICON®. Observa-se, nas três replicadas uma homogeneidade ao longo do esmalte, onde se evidenciam algumas Bandas de Hunter Schreger.

Grupo C

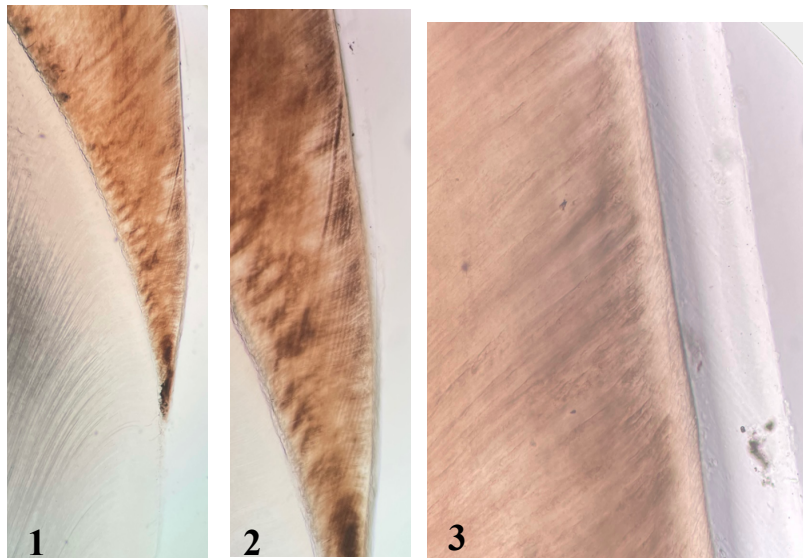


Figura 35. Fotomicrografia de corte transversal, na zona disto-cervical do esmalte (Magnificação x4 (1), x10 (2) e x40 (3)), após indução de lesão artificial de *white-spot* e aplicação resina infiltrante ICON®. Observa-se uma heterogeneidade ao longo da camada de esmalte com maior evidência das Bandas de Hunter Schreger.

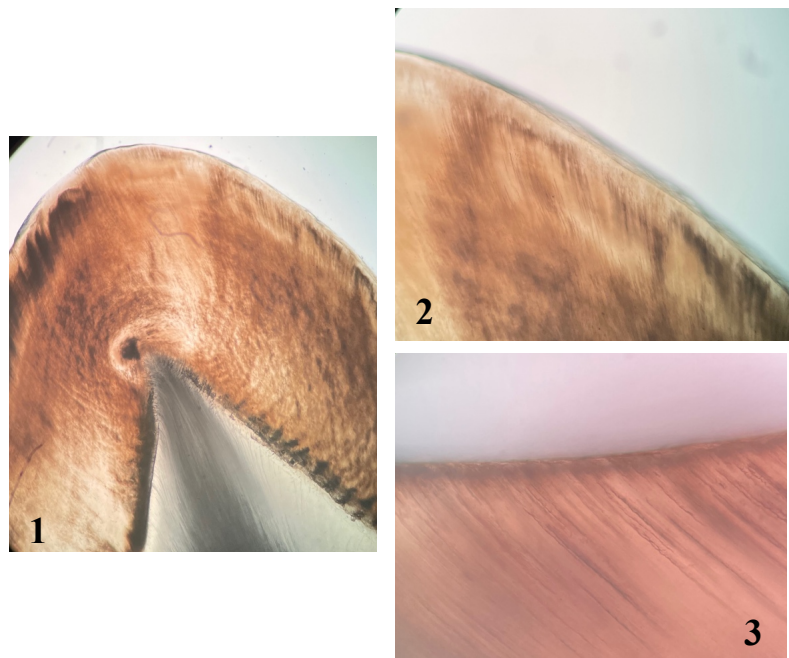


Figura 36. Fotomicrografia de corte transversal, na zona coronária distal do esmalte (Magnificação x4 (1), x10 (2) e x40 (3)), após indução de lesão artificial de *white-spot* e aplicação resina infiltrante ICON®. Observa-se uma mancha heterogênea com maior evidência das Bandas de Hunter Schreger.

Grupo D⁺ (Controlo Positivo)

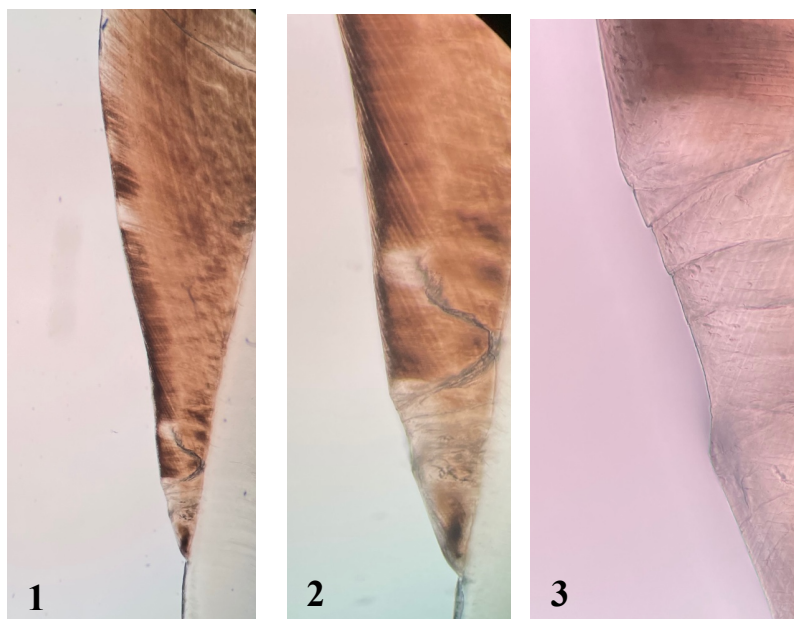


Figura 37. Fotomicrografia de corte transversal, na zona mesio-cervical do esmalte (Magnificação x4 (1), x10 (2) e x40 (3)), após indução de lesão artificial de *white-spot* e conservação em saliva artificial. Observam-se lacunas na superfície do esmalte.

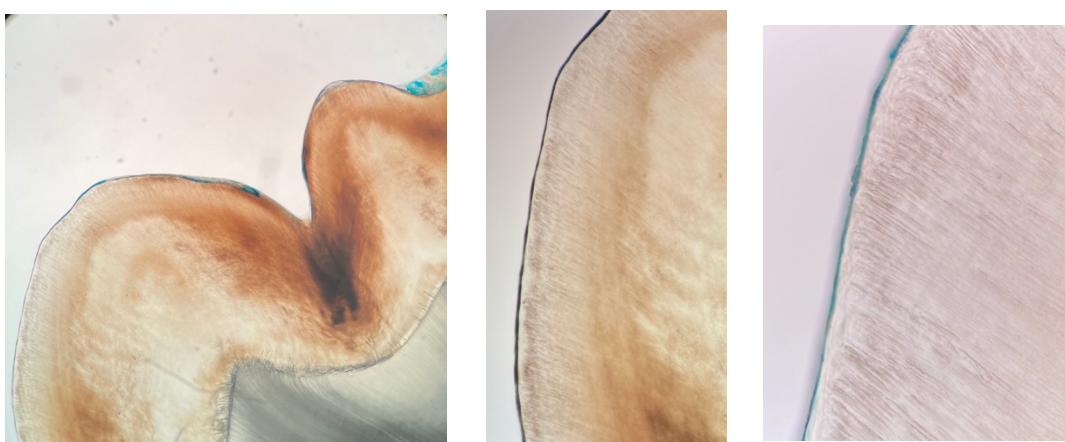


Figura 38. Fotomicrografia de corte transversal, na zona coronária mesial do esmalte (Magnificação x4 (1), x10 (2) e x40 (3)), após indução de lesão artificial de *white-spot* e conservação em saliva artificial. Observam-se lacunas na superfície do esmalte, estando o esmalte mais heterogéneo.

Grupo D (Controlo Negativo)

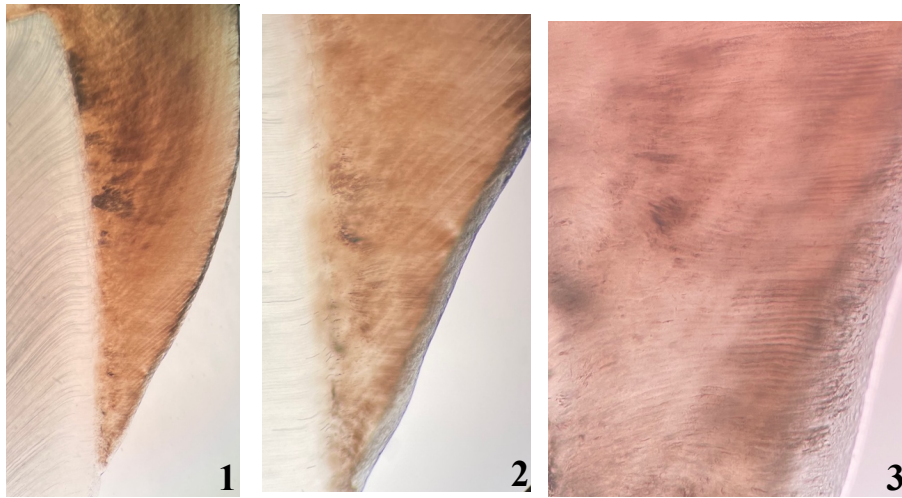


Figura 39. Fotomicrografia de corte transversal, na zona disto-cervical do esmalte (Magnificação x4 (1), x10 (2) e x40 (3)), após indução de lesão artificial de *white-spot* e conservação em água desionizada. Observa-se uma superfície heterogénea, onde são visíveis Bandas de Hunter Schreger desorganizadas.

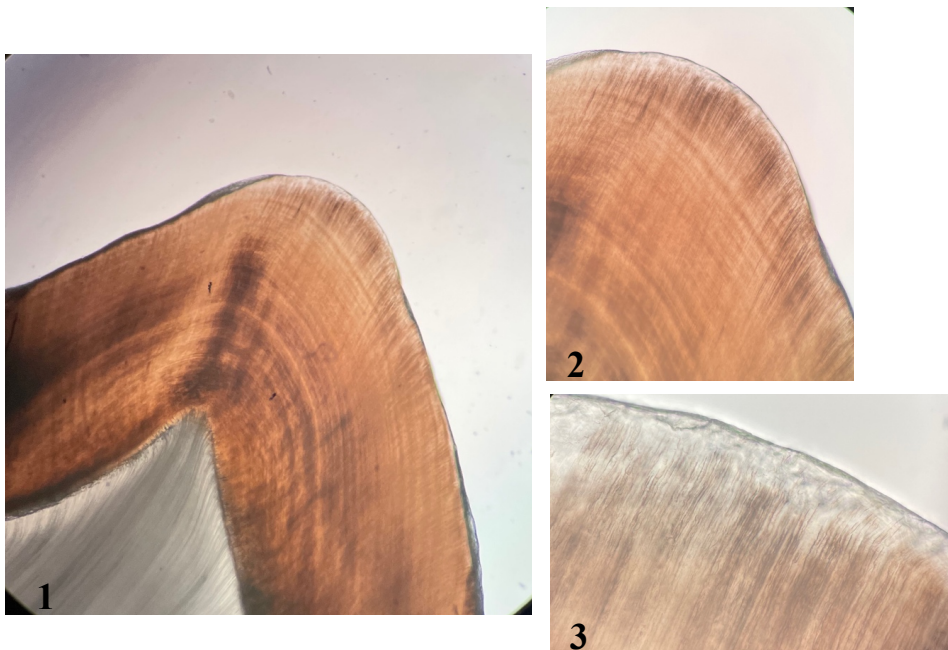
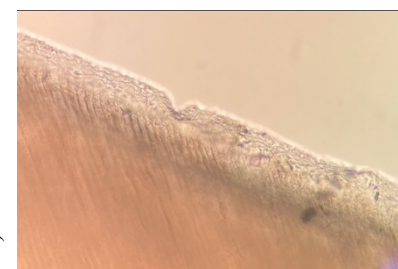
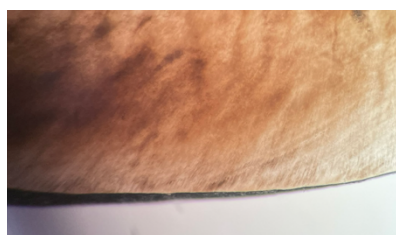
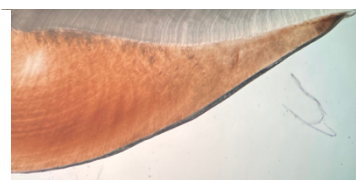
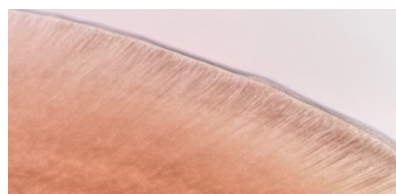
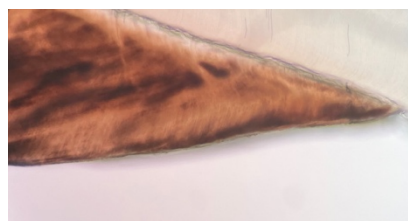
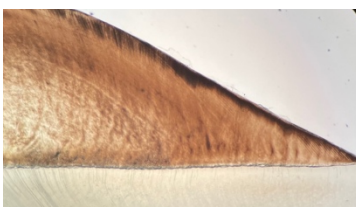
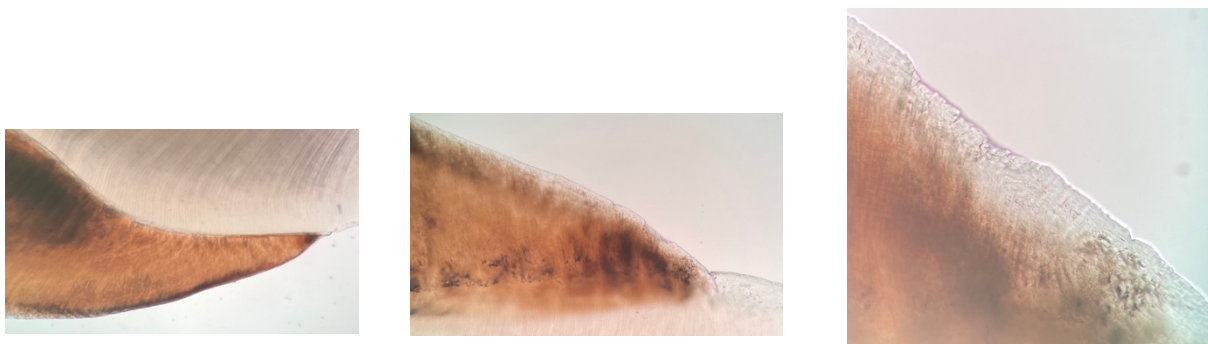


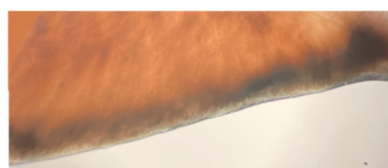
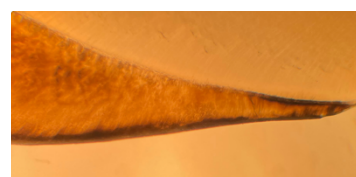
Figura 40. Fotomicrografia de corte transversal, na zona da cúspide distal do esmalte (Magnificação x4 (1), x10 (2) e x40 (3)), após indução de lesão artificial de *white-spot* e conservação em água desionizada. Observa-se uma larga superfície heterogénea.

Figura 41. Esquema das imagens obtidas por MO, na zona cervical, nas diferentes magnificações usadas

Grupo A, B, C, D⁺ e D⁻ (x4)



Grupo A, B, C, D⁺ e D⁻ (x10)



Grupo A, B, C, D⁺ e D⁻ (x40)

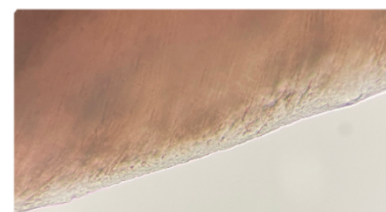
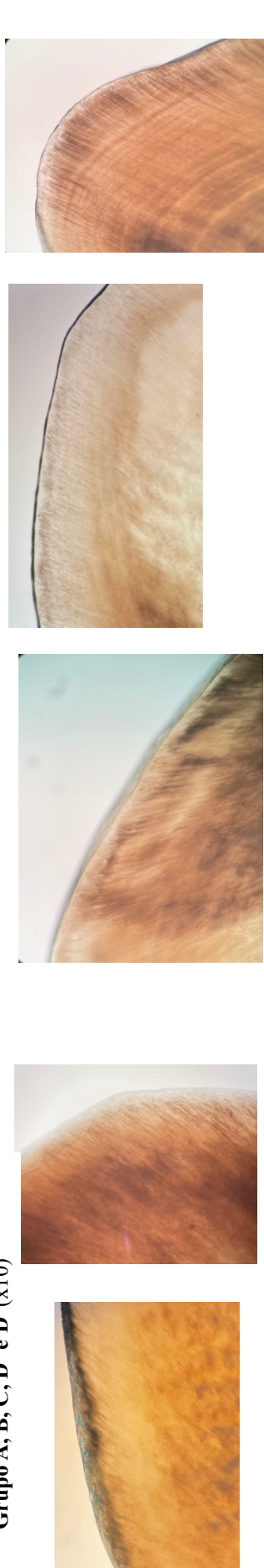


Figura 42. Esquema das imagens obtidas por MO, na zona coronária, nas diferentes magnificações usadas

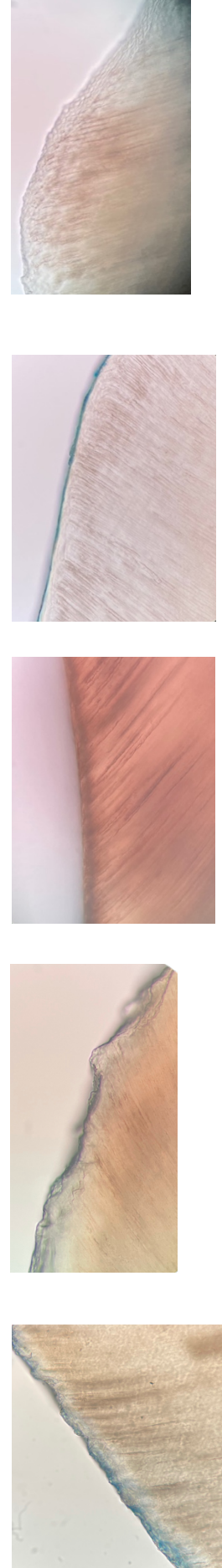
Grupo A, B, C, D⁺ e D⁻ (x4)



Grupo A, B, C, D⁺ e D⁻ (x10)



Grupo A, B, C, D⁺ e D⁻ (x40)



V. DISCUSSÃO

Hoje em dia, deparamo-nos cada vez mais com uma ampla oferta de produtos e estratégias que nos permitem remineralizar lesões incipientes de cárie em esmalte. Deste modo, a necessidade de terapias invasivas para o tratamento de WSL tem tendência a diminuir, dando lugar à detecção precoce e ao tratamento minimamente invasivo de tais lesões (El Meligy *et al.*, 2021).

A remineralização surge como uma estratégia que permite conservar a estrutura dentária existente, promovendo o aporte de minerais para o esmalte desmineralizado, aumentando a resistência do mesmo para futuras desmineralizações que possam advir (Sahiti *et al.*, 2020). Para além de produtos que promovem a remineralização, o uso de resinas infiltrantes para tratar as WSL tem sido cada vez mais documentado (Shimaa *et al.*, 2016).

A detecção de lesões incipientes de cárie é de extrema importância, contribuindo para tal um bom diagnóstico visual e tátil, radiográfico e idealmente histológico (Mehanny *et al.*, 2021). Deste modo, a presente investigação teve como mote a análise sistemática do aspeto histológico do estado do esmalte humano, interpretando as características estruturais e biológicas do mesmo, após terem sido induzidas lesões artificiais de cárie dentária, promovendo a sua remineralização e/ou o preenchimento de espaços da matriz desmineralizada com diferentes agentes, tais como o CPP-ACP e o ICON. Constitui também objetivo deste estudo, aferir a utilidade e eficácia da microscopia ótica, bem como da radiovisiografia como mais um auxiliar na classificação da doença de cárie, uma vez que o uso da MO está pouco documentado na literatura, privilegiando-se sempre o uso da microscopia eletrónica para o estudo da doença cárie.

1. Pertinência do estudo

A microscopia ótica está muito pouco documentada na literatura para o estudo da doença cárie, privilegiando-se sempre o uso da microscopia eletrónica, como tal, este estudo pretende aferir a utilidade da MO como mais um complemento adjuvante ao diagnóstico clínico e radiológico, para o estudo e diagnóstico da doença cárie.

Não obstante, a pertinência do estudo passa igualmente por privilegiar as estratégias minimamente invasivas que visam a remineralização e/ou a infiltração de lesões

incipientes de cárie, em esmalte, avaliando a sua eficácia, uma vez que se caminha para uma Medicina Dentária cada vez mais preventiva e minimamente invasiva.

2. Radiovisiografia Digital

Através da análise das diferentes radiovisiografias, pode concluir-se que tanto para o grupo A, como B, C e D não se observaram diferenças significativas nos diferentes estágios. Este achado é corroborado por Vaswani e autores (2018), Foros *et al.*, (2021), bem como por Wenzel e autores (1991), visto que apenas com uma perda mineral a partir de 30% é que se detetam lesões cariosas em esmalte. Assim, como não é possível observar achados radiotransparentes compatíveis com WSL, induzidos através do método apresentado, através do RVG, também não se irá observar a remineralização das mesmas lesões.

3. Microscopia ótica (MO)

O uso do microscópio ótico tem inúmeras utilidades, sendo uma importante ferramenta de diagnóstico (Bancroft *et al.*, 2019).

Através da observação ao MO dos diferentes espécimes, pode concluir-se que há diferenças qualitativas na superfície do esmalte aquando da aplicação de um agente remineralizador, bem como através da aplicação de uma resina infiltrante, ou até mesmo sem a aplicação de qualquer produto *à priori*.

Aquando da análise do grupo D (grupo controlo), nomeadamente do grupo D⁺ (controlo positivo), em que os espécimes após indução de WSL foram armazenados em saliva artificial sem qualquer tipo de tratamento, pode constatar-se que houve uma desorganização dos prismas de esmalte compatível com a presença de esmalte desmineralizado. Observam-se lacunas entre os prismas de esmalte que podem ser compatíveis com microporosidades causadas pela desmineralização (Hua *et al.*, 2020).

Deste modo, estes achados vão de encontro ao concluído por Dai e colaboradores (2019), quando afirmaram que a saliva não tem capacidade para remineralizar WSL.

Analisando o grupo D⁻ (controlo negativo), onde os espécimes, após indução de WSL foram armazenados em água desionizada, verificaram-se os mesmos achados histológicos supramencionados, onde se evidenciam lacunas causadas pela desmineralização, bem como uma superfície de esmalte heterogénea (Hua *et al.*, 2020).

No grupo A, no qual foi aplicado CPP-ACP pode constatar-se que as lacunas de esmalte aparentam estar preenchidas com depósitos minerais, resultando numa superfície mais homogênea. Estes achados vão de acordo com estudos elaborados por Indrapriyaadharshini *et al.*, (2018), Guzmán-Armstrong *et al.*, (2010) e Hua *et al.*, (2020) onde constataram que a aplicação de CPP-ACP é eficaz na remineralização de lesões de *white-spot*.

No grupo B, ao analisar as fotomicrografias, conclui-se que ao aplicar CPP-ACP e ICON® as superfícies de esmalte aparentam estar ligeiramente menos homogêneas que o grupo anterior, sendo mais notória a presença de Bandas de Hunter Schreger, (Perdigão, 2019). A superfície de esmalte parece estar preenchida com matéria compatível com cálcio e fosfato da pasta CPP-ACP, ou com resina infiltrante. Facto corroborado por Perdigão (2019), onde comprovou que o ICON era eficaz em remineralizar WSL ao formar *resin tags* nos espaços desmineralizados. Como supramencionado, em diversos estudos, o CPP-ACP demonstrou ser mais uma vez eficaz.

Atendendo ao grupo C, onde os espécimes foram armazenados em saliva artificial por quatro semanas e seguidamente foi aplicada a resina infiltrante ICON®, deparamo-nos com uma superfície de esmalte mais heterogênea, onde as bandas de Hunter Schreger, se apresentam mais evidentes do que em qualquer outro grupo. Estes achados são compatíveis com a presença de remineralização, sendo então a resina infiltrante ICON eficaz no tratamento de WSL, tal como corroborado nos estudos de Cazzolla *et al.*, (2018) e El Meligy *et al.*, (2021).

4. Limitações do Estudo e Perspetivas Futuras

O presente estudo apresenta várias limitações, primeiramente por ser um estudo novo, com uma metodologia pioneira, nunca antes usada, e secundariamente por ser um estudo *ex vivo*, acarretando com todas as consequências que daí advêm.

A doença cárie é uma patologia multifatorial, sendo um enorme desafio simular todos os fatores que a influenciam, além disso, ao tentarmos simular as condições existentes na cavidade oral, há que ter em mente que estas nunca irão representar fidedignamente o que acontece realmente na cavidade oral, sendo importante ter este fator em conta aquando da interpretação de resultados. O uso de saliva artificial acaba por ser uma limitação do estudo.

Tendo em conta a metodologia usada, são necessários mais estudos para que o procedimento de corte fique totalmente afinado e não haja o risco de se perderem amostras.

A marcação e identificação das amostras em si, apresenta-se como uma limitação uma vez que pode mascarar os resultados obtidos, sendo assim, como perspectiva futura, contemplamos a elaboração de uma técnica que permita a identificação das amostras sem tingir as mesmas.

A padronização da espessura dos espécimes também é algo a melhorar, aferindo qual a melhor espessura.

Ao ser uma análise subjetiva e qualitativa, propomos em estudos futuros calibrar investigadores quanto à presença ou ausência de remineralização, tendo por base o nosso estudo, para que em investigações que advenham da metodologia aqui descrita, possam sair resultados mais objetivos.

Em estudos futuros, para avaliar melhor a eficácia de cada agente remineralizador/estabilizador, propomos a medição da espessura de remineralização/infiltração ocorrente, avaliando a sua profundidade.

Propomos a realização de mais estudos para afinar a metodologia empregue, tentando mesmo trabalhar para obtermos métodos capazes de estudar a histologia do esmalte *in vivo*, para que no futuro o diagnóstico histológico possa integrar parte da nossa prática clínica, uma vez que se constitui como o meio auxiliar de diagnóstico da doença cárie *gold standard*.

VI. CONCLUSÃO

Tendo em conta os resultados obtidos, e contemplando todas as limitações inerentes à investigação, concluímos que:

- Ao ser uma análise qualitativa, torna-se um pouco subjetiva, no entanto podemos afirmar que histologicamente, tanto o agente remineralizador extrínseco, como a resina infiltrante alteraram a superfície do esmalte, ao preencherem e/ou infiltrarem as lacunas deixadas pela desmineralização.
- Quando comparados com o grupo de controlo negativo, todos os grupos, exceto o de controlo positivo, apresentaram diferenças qualitativas na sua superfície, que poderão ser compatíveis com remineralização.
- A aplicação exclusiva de CPP-ACP apresenta um preenchimento de espaços superior àquele onde as amostras apenas estão submersas em saliva artificial, apresentando o esmalte, um aspeto microscópico que poderá ser compatível com remineralização.
- Ao se aplicar CPP-ACP, como pré-tratamento, aplicando de seguida resina infiltrante, verifica-se uma homogeneidade dos prismas de esmalte comparativamente com a aplicação exclusiva de ICON®, sendo possível aferir que a aplicação de um agente remineralizador como pré-tratamento se sobrepõe à aplicação da resina infiltrante, apresentando igualmente, um maior preenchimento de lacunas, do que apenas com a aplicação da resina infiltrante.
- A aplicação de CPP-ACP em conjunto com uma resina infiltrante não aparenta ter um maior preenchimento de espaços do que a aplicação exclusiva de CPP-ACP.
- Aquando do uso da resina infiltrante, verificam-se alterações qualitativas no esmalte, compatíveis com remineralização, sendo estas alterações, mais notórias do que as observadas nas amostras imersas em saliva artificial.
- O RVG como meio auxiliar de diagnóstico para achados radiotransparentes em esmalte, induzidos com o protocolo referido, mostrou-se pouco eficaz, sendo o seu uso mais preconizado para cáries de maiores dimensões.
- Relativamente ao microscópio ótico como mais um auxiliar no diagnóstico da doença cárie, pode concluir-se que o mesmo se apresenta eficaz, devendo o diagnóstico histológico, complementar o diagnóstico clínico e radiográfico.

VII. BIBLIOGRAFIA

- Abou Neel, E., Aljabo, A., Strange, A., Ibrahim, S., Coathup, M., Young, A., Bozec, L., & Mudera, V. (2016). Demineralization-remineralization dynamics in teeth and bone. *International Journal of Nanomedicine*, Volume 11, 4743–4763. <https://doi.org/10.2147/IJN.S107624>
- Amendoeira, M. R. R., Caputo, L. F. G., Molinaro, E. M., & Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio. (2010). Técnicas histológicas. In *Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde* (Vol. 2, pp. 90–188). EPSJV. <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/8659>
- American Academy of Pediatric Dentistry. (2020). Fluoride therapy. The Reference Manual of Pediatric Dentistry. https://www.aapd.org/media/Polices_Guidelines/BP_FluorideTherapy.pdf
- Bancroft, J. D., Suvana, S.K. & Layton, C. (2019). *Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques: Expert Consult: Online and Print* (8th ed.) [E-book]. Elsevier
- Belém, M.D.F. (2011). *Diagnóstico radiográfico de cárie induzida artificialmente utilizando imagens de tomografia computadorizada de feixe cônico e radiografia digital com a aplicação de filtros de realce* [Tese de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba]. <http://repositorio.unicamp.br/jspui/handle/REPOSIP/288979>
- Beniash, E., Stifler, C.A., Sun, C.Y., Jung, G.S., Qin, Z., Buehler, M.J., & Gilbert, P. (2019). The hidden structure of human enamel. *Nat Commun*, 10(1), 43-83. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12185-7>
- Borges, B. C., de Souza Borges, J., de Araújo, L. S., Machado, C. T., Dos Santos, A. J., & de Assunção Pinheiro, I. V. (2011). Update on nonsurgical, ultraconservative approaches to treat effectively non-cavitated caries lesions in permanent teeth. *European journal of dentistry*, 5(2), 229–236. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3075999/>
- Braun, A., Guiraud, L. M. J. C., & Frankenberger, R. (2016). Histological validation of ICDAS II and radiological assessment of occlusal carious lesions in permanent teeth. *Odontology*, 105(1), 46–53. <https://doi.org/10.1007/s10266-016-0245-6>
- Bulina, N. V., Chaikina, M. V., Prosanov, I. Y., & Dudina, D. V. (2020). Strontium and silicate co-substituted hydroxyapatite: Mechanochemical synthesis and structural

- characterization. *Materials Science and Engineering B: Solid-State Materials for Advanced Technology*, 262(March), 114719. <https://doi.org/10.1016/j.mseb.2020.114719>
- Buskes, J. A. K. M., Christoffersen, J., & Arends, J. (1985). Lesion Formation and Lesion Remineralization in Enamel under Constant Composition Conditions. *Caries Research*, 19(6), 490–496. <https://doi.org/10.1159/000260887>
- 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>
- Cazzolla, A. P., de Franco, A. R., Lacaita, M., & Lacarbonara, V. (2018). Efficacy of 4-year treatment of icon infiltration resin on postorthodontic white spot lesions. *BMJ Case Reports*, bcr-2018. <https://doi.org/10.1136/bcr-2018-225639>
- Chaudhari, N., & Roper, S. D. (2010). The cell biology of taste. *Journal of Cell Biology*, 191(2), 429. <https://doi.org/10.1083/jcb.20100314420100927c>
- Chawhuaveang, D. D., Yu, O. Y., Yin, I. X., Lam, W. Y.-H., Mei, M. L., & Chu, C.-H. (2020). Acquired salivary pellicle and oral diseases: A literature review. *Journal of Dental Sciences*, 16 (1), 523-529. <https://doi.org/10.1016/j.jds.2020.10.007>
- Chen, F., & Wang, D. (2010). Novel technologies for the prevention and treatment of dental caries: a patent survey. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 20(5), 681–694. <https://doi.org/10.1517/13543771003720491>
- Cochrane, N. J., Cai, F., Huq, N. L., Burrow, M. F., & Reynolds, E. C. (2010). New Approaches to Enhanced Remineralization of Tooth Enamel. *Journal of Dental Research*, 89(11), 1187–1197. <https://doi.org/10.1177/0022034510376046>
- Dai, Z., Liu, M., Ma, Y., Cao, L., Xu, H. H. K., Zhang, K., & Bai, Y. (2019). Effects of Fluoride and Calcium Phosphate Materials on Remineralization of Mild and Severe White Spot Lesions. *BioMed Research International*, 1–13. <https://doi.org/10.1155/2019/1271523>
- Dawes, C., Pedersen, A., Villa, A., Ekström, J., Proctor, G., Vissink, A., Aframian, D., McGowan, R., Aliko, A., Narayana, N., Sia, Y., Joshi, R., Jensen, S., Kerr, A., & Wolff, A. (2015). The functions of human saliva: A review sponsored by the World Workshop on Oral Medicine VI. *Archives of Oral Biology*, 60(6), 863–874. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2015.03.004>

- Dayila, J. M., Buonocore, M. G., Greeley, C. B., & Provenza, D. V. (1975). Adhesive Penetration in Human Artificial and Natural White Spots. *Journal of Dental Research*, 54(5), 999–1008. <https://doi.org/10.1177/00220345750540054201>
- El-Housseiny, A., & Jamjoum, H. (2002). Evaluation of visual, explorer, and a laser device for detection of early occlusal caries. *Journal of Clinical Pediatric Dentistry*, 26(1), 41–48. <https://doi.org/10.17796/jcpd.26.1.ch28322k5837j772>
- Elkassas, D., & Arafa, A. (2014). Remineralizing efficacy of different calcium-phosphate and fluoride based delivery vehicles on artificial caries like enamel lesions. *Journal of Dentistry*, 42(4), 466–474. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2013.12.017>
- El Meligy, O., Alamoudi, N. M., Eldin Ibrahim, S. T., Felemban, O. M., & Al-Tuwirqi, A. A. (2021). Effect of resin infiltration application on early proximal caries lesions in vitro. *Journal of dental sciences*, 16(1), 296–303. <https://doi.org/10.1016/j.jds.2020.04.005>
- Ewoldsen, N., & Koka, S. (2010). There are no Clearly Superior Methods for Diagnosing, Predicting, and Noninvasively Treating Dental Caries. *Journal of Evidence Based Dental Practice*, 10(1), 16–17. <https://doi.org/10.1016/j.jebdp.2009.11.008>
- Farooq, I., & Bugshan, A. (2021). The role of salivary contents and modern technologies in the remineralization of dental enamel: a narrative review. *F1000Research*, 9, 171. <https://doi.org/10.12688/f1000research.22499.3>
- FEATHERSTONE, J. D. (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>
- Foros, P., Oikonomou, E., Koletsi, D., & Rahiotis, C. (2021). Detection Methods for Early Caries Diagnosis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Caries Research*, 55(4), 247–259. <https://doi.org/10.1159/000516084>
- Gibbins, H. L., Yakubov, G. E., Proctor, G. B., Wilson, S., & Carpenter, G. H. (2014). What interactions drive the salivary mucosal pellicle formation? *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 120, 184–192. <https://dx.doi.org/10.1016%2Fj.colsurfb.2014.05.020>
- González-Cabezas, C., & Fernández, C. (2018). Recent Advances in Remineralization Therapies for Caries Lesions. *Advances in Dental Research*, 29(1), 55–59. <https://doi.org/10.1177/0022034517740124>

- Gorelick, L., Geiger, A. M., & Gwinnett, A. J. (1982). Incidence of white spot formation after bonding and banding. *American Journal of Orthodontics*, 81(2), 93–98. [https://doi.org/10.1016/0002-9416\(82\)90032-X](https://doi.org/10.1016/0002-9416(82)90032-X)
- 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>
- GULEC, A., & GOYMEN, M. (2019). Assessment of the resin infiltration and CPP-ACP applications before orthodontic brackets bonding. *Dental Materials Journal*, 38(5), 854–860. <https://doi.org/10.4012/dmj.2019-021>
- Guzmán-Armstrong, S., Chalmers, J., & Warren, J. J. (2010). White spot lesions: Prevention and treatment. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*, 138(6), 690–696. <https://doi.org/10.1016/j.ajodo.2010.07.007>
- Hara, A. T., & Zero, D. T. (2010). The Caries Environment: Saliva, Pellicle, Diet, and Hard Tissue Ultrastructure. *Dental Clinics of North America*, 54(3), 455–467. <https://doi.org/10.1016/j.cden.2010.03.008>
- Hayashi, T., Nagayasu, T., Kohno, S., Abe, K., Tamaru, N., Anami, M., Sakai, Y., & Ohbayashi, C. (2005). Better choice of fixatives provides better histological details of the alveolar-capillary interface. *Pathology*, 37(5), 355–359. <https://doi.org/10.1080/00313020500253307>
- Hector, M., & Linden, R. (1999). Reflexes of Salivary Secretion. *Neural Mechanisms of Salivary Gland Secretion*, 196–217. <https://doi.org/10.1159/000061114>
- Hegde, M.H., Attavar, S.H., Shetty, N., Hegde, N.D., & Hegde, N.N. (2019). Saliva as a biomarker for dental caries: A systematic review. *Journal of Conservative Dentistry*, 22(1), 2–6. https://dx.doi.org/10.4103%2FJCD.JCD_531_18
- Heller, D., Helmerhorst, E. J., & Oppenheim, F. G. (2016). Saliva and Serum Protein Exchange at the Tooth Enamel Surface. *Journal of Dental Research*, 96(4), 437–443. <https://doi.org/10.1177/0022034516680771>
- Hu, Y., Smith, C. E., Cai, Z., Donnelly, L. A.-J., Yang, J., Hu, J. C.-C., & Simmer, J. P. (2016). Enamel ribbons, surface nodules, and octacalcium phosphate in C57BL/6Amelx^{-/-}mice and Amelx^{+/-}lyonization. *Molecular Genetics & Genomic Medicine*, 4(6), 641–661. <https://doi.org/10.1002/mgg3.252>
- Hua, F., Yan, J., Zhao, S., Yang, H., & He, H. (2020). In vitro remineralization of enamel white spot lesions with a carrier-based amorphous calcium phosphate delivery

- system. *Clinical Oral Investigations*, 24(6), 2079–2089. <https://doi.org/10.1007/s00784-019-03073-x>
- Indrapriyadharshini, K., Madan Kumar, P. D., Sharma, K., & Iyer, K. (2018). Remineralizing potential of CPP-ACP in white spot lesions – A systematic review. *Indian J Dent Res*, 29(4), 487–496. <https://www.ijdr.in/text.asp?2018/29/4/487/239390>
- Ionta, F. Q., Mendonça, F. L., De Oliveira, G. C., 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>
- Iranzo-Cortés, J. E., Almarche-Tarazona, M., Montiel-Company, J. M., & Almerich-Silla, J. M. (2017). Diagnostic validity of ICDAS II, VistaProof and a combination of these two methods. An in vitro study in pre-cavitated lesions. *Lasers in Surgery and Medicine*, 50(2), 166–173. <https://doi.org/10.1002/lsm.22751>
- 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>
- Jablonski-Momeni, A., Stachniss, V., Ricketts, D., Heinzl-Gutenbrunner, M., & Pieper, K. (2008). Reproducibility and Accuracy of the ICDAS-II for Detection of Occlusal Caries in vitro. *Caries Research*, 42(2), 79–87. <https://doi.org/10.1159/000113160>
- Jayarajan, J., Janardhanam, P., Jayakumar, P., & Deepika. (2011). Efficacy of CPP-ACP and CPP-ACPF on enamel remineralization - An in vitro study using scanning electron microscope and DIAGNOdent®. *Indian Journal of Dental Research*, 22(1), 77. <https://doi.org/10.4103/0970-9290.80001>
- Khoroushi, M., & Kachuie, M. (2017). Prevention and Treatment of White Spot Lesions in Orthodontic Patients. *Contemporary clinical dentistry*, 8(1), 11–19. https://doi.org/10.4103/ccd.ccd_216_17
- Kielbassa, A.M., Muller, J. & Gernhardt, C.R. (2009). Closing the gap between oral hygiene and minimally invasive dentistry: a review of the resin infiltration technique of incipient (proximal) enamel lesions. *British Dental Journal*, 207(9), 425. <https://doi.org/10.1038/sj.bdj.2009.972>

- Koldehoff, J., Swain, M. V., & Schneider, G. A. (2020). The geometrical structure of interfaces in dental enamel: A FIB-STEM investigation. *Acta Biomaterialia*, 104, 17–27. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2019.12.040>
- 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>
- Levine, M. (2011). *tm* (2011th ed.) [E-book]. Springer.
- Licata, O., Guha, U., Poplawsky, J.D., Aich, N., & Mazumder, B. (2020). Probing Heterogeneity in Bovine Enamel Composition through Nanoscale Chemical Imaging using Atom Probe Tomography. *Archives of Oral Biology*, 112, 104682. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2020.104682>
- Lussi, A., Hellwig, E. & Klimek, J. (2012). Fluorides - mode of action and recommendations for use. *Schweiz Monatsschr Zahnmed*, 122(11):1030-42. PMID: 23192605
- Lynch, R. J. M., & Smith, S. R. (2012). Remineralization Agents – New and Effective or Just Marketing Hype? *Advances in Dental Research*, 24(2), 63–67. <https://doi.org/10.1177/0022034512454295>
- Lynnerup, N., & Klaus, H. D. (2019). Fundamentals of Human Bone and Dental Biology. *Ortner's Identification of Pathological Conditions in Human Skeletal Remains*, 35–58. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-809738-0.00004-1>
- Marsh, P. D., Do, T., Beighton, D., & Devine, D. A. (2015). Influence of saliva on the oral microbiota. *Periodontology* 2000, 70(1), 80–92. <https://doi.org/10.1111/prd.12098>
- Medeiros, G.C. (2011). *Aspetos clínicos, radiográficos e histológicos da superfície oclusal de molares decíduos com e sem lesão de cárie: estudo in vitro* [Tese de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Norte]. <https://repositorio.ufrn.br/jspui/handle/123456789/17069?mode=full>
- Mehanny, M., AlMohareb, R. A., & Noujeim, M. (2021). Effect of Amalgam Restorations and Operation Parameters on Diagnostic Accuracy of Caries Detection Using Cone Beam Computed Tomography: An In Vitro Study. *Scanning*, 2021, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2021/2679012>
- Metwally, S., & Stachewicz, U. (2020). Teeth resorption at cement - enamel junction (CEJ) - Microscopy analysis. *Micron*, 137, 102913. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2020.102913>

- Mutahar, M., Carpenter, G., Bartlett, D., German, M., & Moazzez, R. (2017). The presence of acquired enamel pellicle changes acid-induced erosion from dissolution to a softening process. *Scientific Reports*, 7(1), 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11498-1>
- Nanci, A. (2017). *Ten Cate's Oral Histology: Development, Structure, and Function* (9th ed.) [E-book]. Elsevier
- Niklander, S., Veas, L., Barrera, C., Fuentes, F., Chiappini, G., & Marshall, M. (2017). Risk factors, hyposalivation and impact of xerostomia on oral health-related quality of life. *Brazilian Oral Research*, 31(14), 1–9. <https://doi.org/10.1590/1807-3107BOR-2017.vol31.0014>
- Nishio, C. (2008). Formação do esmalte dentário, novas descobertas, novos horizontes. *Revista Dental Press De Ortodontia E Ortopedia Facial*, 13 (4), 17-18. <https://www.researchgate.net/deref/http%3A%2F%2Fdx.doi.org%2F10.1590%2F1415-54192008000400002>
- Oliveira, G. M. S., Ritter, A. V., Heymann, H. O., Swift, E., Donovan, T., Brock, G., & Wright, T. (2014). Remineralization effect of CPP-ACP and fluoride for white spot lesions in vitro. *Journal of Dentistry*, 42(12), 1592–1602. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2014.09.004>
- Paiva, J. G. A. D., Fank-de-Carvalho, S. M., Magalhães, M. P., & Graciano-Ribeiro, D. (2006). Verniz vitral incolor 500®: uma alternativa de meio de montagem economicamente viável. *Acta Botanica Brasilica*, 20(2), 257–264. <https://doi.org/10.1590/s0102-33062006000200002>
- Pajor, K., Pajchel, L., & Kolmas, J. (2019). Hydroxyapatite and Fluorapatite in Conservative Dentistry and Oral Implantology-A Review. *Materials*, 12(17), 2683. <https://doi.org/10.3390/ma12172683>
- 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>
- Perdigão, J. (2019). Resin infiltration of enamel white spot lesions: An ultramorphological analysis. *Journal of Esthetic and Restorative Dentistry*, 32(3), 1-8. <https://doi.org/10.1111/jerd.12550>
- Peres, R. C. R., Camargo, G., Mofatto, L. S., Cortellazzi, K. L., Santos, M. C. L. G., Santos, M. N., Bergamaschi, C. C., & Line, S. R. P. (2009). Association of

- polymorphisms in the carbonic anhydrase 6 gene with salivary buffer capacity, dental plaque pH, and caries index in children aged 7–9 years. *The Pharmacogenomics Journal*, 10(2), 114–119. <https://doi.org/10.1038/tpj.2009.37>
- Petrone, S. & Garizoain, G. (2017). ANÁLISIS HISTOLÓGICO DEL ESMALTE DENTARIO DESDE UNA PERSPECTIVA ANTROPOLÓGICA. TÉCNICA DE CORTE DELGADO PARA MICROSCOPIA ÓPTICA. *Cuadernos Del Instituto Nacional de Antropología y Pensamiento Latinoamericano - Series Especiales*, 4(4), 108–116. https://www.researchgate.net/publication/337170929_ANALISIS_HISTOLOGICO_DEL_ESMALTE_DENTARIO_DESDE_UNA_PERSPECTIVA_ANTROPOLOGICA_TECNICA_DE_CORTE_DELGADO_PARA_MICROSCOPIA_OPTICA
- Pham, C.-D., Smith, C. E., Hu, Y., Hu, J. C.-C., Simmer, J. P., & Chun, Y.-H. P. (2017). Endocytosis and Enamel Formation. *Frontiers in Physiology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00529>
- Philip, N. (2018). 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., & Ekstrand, K. (2013). International Caries Detection and Assessment System (ICDAS) and its International Caries Classification and Management System (ICCMS) - methods for staging of the caries process and enabling dentists to manage caries. *Community Dentistry and Oral Epidemiology*, 41(1), e41–e52. <https://doi.org/10.1111/cdoe.12025>
- Pitts, N. B., & Wright, J. P. (2018). Reminova and EAER: Keeping Enamel Whole through Caries Remineralization. *Advances in Dental Research*, 29(1), 48–54. <https://doi.org/10.1177%2F0022034517737026>
- Pitts, N. B., Zero, D. T., Marsh, P. D., Ekstrand, K., Weintraub, J. A., Ramos-Gomez, F., Tagami, J., Twetman, S., Tsakos, G., & Ismail, A. (2017). Dental caries. *Nature Reviews Disease Primers*, 3(1). <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>
- Quintas, P.M.S. (2014). *Fármacos com atividade auto-regeneradora do esmalte dentário* [Tese de mestrado, Instituto Universitário Egas Moniz]. Repositório Comum, IUEM. <http://hdl.handle.net/10400.26/13082>

- Ramadoss, R., Padmanaban, R., & Subramanian, B. (2021). Role of bioglass in enamel remineralization: Existing strategies and prospects—A narrative review. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. Published. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.34904>
- Robinson, C., Shore, R. C., Brookes, S. J., Strafford, S., Wood, S. R., & Kirkham, J. (2000). The Chemistry of Enamel Caries. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 11(4), 481–495. <https://doi.org/10.1177/10454411000110040601>
- Rodrigues, J. A., Neuhaus, K. W., Diniz, M. B., Hug, I., Stich, H., Karlsson, L., & Lussi, A. (2011). Comparison among gold standard techniques used for the validation of methods for occlusal caries detection. *Microscopy Research and Technique*, 75(5), 605–608. <https://doi.org/10.1002/jemt.21097>
- Sahiti, J. S., Krishna, N. V., Prasad, S. D., Kumar, C. S., Kumar, S. S., & Babu, K. (2020). Comparative evaluation of enamel microhardness after using two different remineralizing agents on artificially demineralized human enamel: An *in vitro* study. *Journal of clinical and translational research*, 6(3), 87–91. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7790502/>
- Sala, E. C., & García, P. B. (2013). *Odontología preventiva y comunitaria - Principios, Métodos y Aplicaciones*. (Elsevier, Ed.) (4^a Edição).
- Sampson, V. & Sampson, A. (2020). Diagnosis and treatment options for anterior white spot lesions. *BRITISH DENTAL JOURNAL*, 229 (6): 348-352. <https://doi.org/10.1038/s41415-020-2057-x>
- Santos, E. J. L. D., Meira, I. A., Sousa, E. T. D., Amaechi, B. T., Sampaio, F. C., & Oliveira, A. F. B. D. (2019). Erosive potential of soy-based beverages on dental enamel. *Acta Odontologica Scandinavica*, 77(5), 340–346. <https://doi.org/10.1080/00016357.2019.1570330>
- Shahmoradi, M., Hunter, N., & Swain, M. (2017). Efficacy of Fluoride Varnishes with Added Calcium Phosphate in the Protection of the Structural and Mechanical Properties of Enamel. *BioMed Research International*, 2017, 1-7. <https://doi.org/10.1155/2017/7834905>
- Shetty S, Hegde MN, Bopanna TP. (2017). Enamel remineralization assessment after treatment with three different remineralizing agents using surface microhardness: An *in vitro* study. *J Conserv Dent* 2014, 17:49-52 <https://www.jcd.org.in/text.asp?2014/17/1/49/124136>

- Shimaa M, E. Z., Wegdan M, A. E. F., & Sonia M, E. S. (2016). Penetration depth and enamel microhardness of resin infiltrant and traditional techniques for treatment of artificial enamel lesions. *Alexandria Dental Journal*, 41(1), 20–25. <https://doi.org/10.21608/adjalexu.2016.59167>
- Shin, N.Y., Yamazaki, H., Beniash, E., Yang, X., Margolis, S.S., Pugach, M.K., Simmer, & J.P., Margolis, H.C. (2020) Amelogenin phosphorylation regulates tooth enamel formation by stabilizing a transient amorphous mineral precursor. *J Biol Chem*, 295(7), 1943-1959. <https://doi.org/10.1074/jbc.ra119.010506>
- Silva-Fialho, P., Ferreira, R., Leal, J., Tabchoury, C. & Vale, G. (2021). Effect of high-fluoride dentifrice and bracket bonding composite material on enamel demineralization adjacent to orthodontic brackets in vitro. *J Clin Exp Dent*.13(5): 493-8. <https://doi.org/10.4317/jced.57673>
- 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>
- Siqueira, W., Custodio, W., & McDonald, E. (2012). New Insights into the Composition and Functions of the Acquired Enamel Pellicle. *Journal of Dental Research*, 91(12), 1110–1118. <https://doi.org/10.1177/0022034512462578>
- Smith, C. E. (1998). Cellular and Chemical Events During Enamel Maturation. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 9(2), 128–161. <https://doi.org/10.1177/10454411980090020101>
- Thompson, V. P. (2020). The tooth: An analogue for biomimetic materials design and processing. *Dental Materials*, 36(1), 25–42. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2019.08.106>
- Tovo, M., Bervian, J., Freitas, S., Ítalo, J. & Kramer, P. (2003). Validade do exame radiográfico digital no diagnóstico de lesões proximais em molares decíduos. *Revista da Faculdade de Odontologia de Porto Alegre*, 44 (1), 70-75. <https://doi.org/10.22456/2177-0018.103322>
- 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>

- Uysal, T., Amasyali, M., Koyuturk, A., & Ozcan, S. (2010). Effects of different topical agents on enamel demineralization around orthodontic brackets: an in vivo and in vitro study. *Australian Dental Journal*, 55(3), 268–274. <https://doi.org/10.1111/j.1834-7819.2010.01233.x>
- Van der Veen, M. H., Mattousch, T., & Boersma, J. G. (2007). Longitudinal development of caries lesions after orthodontic treatment evaluated by quantitative light-induced fluorescence. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*, 131(2), 223–228. <https://doi.org/10.1016/j.ajodo.2005.07.017>
- Vaswani, S., Sharma, D. S., Mishra, S., & Sharma, S. (2018). Histologic validation of ICDAS-II and polarization sensitive optical coherence tomography to detect smooth surface early carious lesions. *International Journal of Paediatric Dentistry*, 29(2), 193–202. <https://doi.org/10.1111/ipd.12440>
- Wenzel, A., Larsen, M. J., & Feierskov, O. (1991). Detection of Occlusal Caries without Cavitation by Visual Inspection, Film Radiographs, Xeroradiographs, and Digitized Radiographs. *Caries Research*, 25(5), 365–371. <https://doi.org/10.1159/000261393>
- Yavuz, B. S., & Kargul, B. (2021). Comparative evaluation of the spectral-domain optical coherence tomography and microhardness for remineralization of enamel caries lesions. *Dental Materials Journal*, 40(5), 1115–1121. <https://doi.org/10.4012/dmj.2020-279>
- Yetkiner, E., Wegehaupt, F., Wiegand, A., Attin, R., & Attin, T. (2014). Colour improvement and stability of white spot lesions following infiltration, micro-abrasion, or fluoride treatments in vitro. *The European Journal of Orthodontics*, 36(5), 595–602. <https://doi.org/10.1093/ejo/cjt095>

VIII. ANEXOS

1.

ELSEVIER LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Aug 28, 2021

This Agreement between Instituto Universitário Egas Moniz -- Maria Valdez ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.

License Number	5026050212634
License date	Mar 11, 2021
Licensed Content Publisher	Elsevier
Licensed Content Publication	Journal of Biological Chemistry
Licensed Content Title	Amelogenin phosphorylation regulates tooth enamel formation by stabilizing a transient amorphous mineral precursor
Licensed Content Author	Nah-Young Shin,Hajime Yamazaki,Elia Beniash,Xu Yang,Seth S. Margolis,Megan K. Pugach,James P. Simmer,Henry C. Margolis
Licensed Content Date	Feb 14, 2020
Licensed Content Volume	295
Licensed Content Issue	7
Licensed Content Pages	17
Start Page	1943
End Page	1959
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	9
Format	both print and electronic
Are you the author of this Elsevier article?	No
Will you be translating?	Yes, without English rights
Number of languages	1
Title	ESTUDO SOBRE AS CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIAS E BIOLÓGICAS DO ESMALTE, ONDE FORAM INDUZIDAS LESÕES ARTIFICIAIS DE CÁRIE DENTÁRIA
Institution name	Instituto Universitário Egas Moniz
Expected presentation date	Oct 2021
Portions	Figure 9 on page 30
Specific Languages	Portuguese
Requestor Location	Instituto Universitário Egas Moniz Rua Cerrado do Jardim, 20 Mafra, Lisboa 2640-411 Portugal Attn: Instituto Universitário Egas Moniz

2.

