



Observação histológica de dentes de Golfinho: Protocolo

Orientadora

Professora Doutora Cláudia Manuela Pereira Córdova Marcos

Coorientadora

Dra. Luísa Maria da Silva Rosendo Fialho

Trabalho de Projeto apresentado à Escola Superior de Saúde Dr. Lopes Dias do Instituto Politécnico de Castelo Branco em associação com o Hospital Veterinário de Évora para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Licenciado em Ciências Biomédicas Laboratoriais, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Cláudia Manuela Pereira Córdova Marcos, do Instituto Politécnico de Castelo Branco e coorientadora Dra. Luísa Maria da Silva Rosendo Fialho da Universidade de Évora.

Junho | 2025

Composição do júri

Presidente do júri

Professora Doutora Marisa Regina Reduto Santos Barbeira,

Professor Adjunto o da Escola Superior de Saúde Dr. Lopes Dias –
Instituto Politécnico de Castelo Branco

Arguente

Professora. Doutora Carina Alexandra Pereira Valente

Professor Adjunto da Escola Superior de Saúde Dr. Lopes Dias –
Instituto Politécnico de Castelo Branco

Orientador

Professora. Doutora Cláudia Manuela Pereira Córdova Marcos

Professor Adjunto da Escola Superior de Saúde Dr. Lopes Dias –
Instituto Politécnico de Castelo Branco

Agradecimentos

Agradeço primeiramente aos meus professores pelo conhecimento e valores que me passaram ao longo do curso.

Ao meu namorado e amigos agradeço por todo o apoio, pela força que me deram quando eu achava que não tinha mais e pela paciência de me ouvirem sempre que precisava de desabafar.

Obrigada Francisco por teres tornado esta jornada mais leve, por me teres trazido à superfície nos momentos em que me estava a afogar e por conseguires sempre meter-me um sorriso na cara.

Obrigada Lara por teres aparecido na minha vida num período tão difícil, por seres a minha parceira de todos os momentos. Estarão sempre guardadas no meu coração as horas infinitas de desabafos pela madrugada fora que rapidamente se tornavam em conversas sem sentido e risos sem fim.

Ao Ricardo, à Rita e aos restantes membros do nosso grupo agradeço pela família que foram para mim durante a minha presença em Castelo Branco.

Obrigada Ricardo por teres sido a minha âncora, a pessoa que me chamava à terra sempre que eu precisava. O meu melhor amigo nas horas difíceis e a melhor gargalhada que eu podia ouvir. Foste e serás um irmão para mim, independentemente do caminho que seguirmos, estaremos sempre juntos no meu coração.

Aos meus pais e restante família agradeço por todo o apoio e motivação que me deram.

Obrigada mãe por me acalmares sempre que te ligava em desespero, por teres conseguido ser o meu conforto ainda que à distância.

Avó Guida, sem ti a minha vida teria tido um rumo certamente diferente. Obrigada por desde pequenina me incentivares a sonhar alto e a fazer por mim e pelo meu futuro. És casa e és mãe para mim.

Ao meu avô Florival agradeço pelos valores que me passou ao longo da sua vida, o amor é imensurável mas sei que me deste o maior de todos.

Resumo

Os dentes são estruturas complexas constituídas por múltiplas camadas tecidulares, entre as quais se destacam o esmalte, a dentina, o cemento e a polpa dentária. Estas camadas apresentam um padrão comum de organização e mineralização, o que requer cuidados específicos na sua preparação histológica. A fixação e descalcificação dos dentes implicam técnicas cuidadosamente controladas, de forma a preservar a integridade dos tecidos moles presentes, particularmente a polpa.

O presente trabalho teve como objetivo desenvolver um protocolo acessível e eficiente para a preparação histológica de dentes de golfinho, adaptado às limitações técnicas de um laboratório convencional.

Foram obtidas amostras dentárias de espécies de golfinhos, no âmbito do projeto de investigação realizado pelo Laboratório de Ciências do Mar (CIEMAR), pertencente à Universidade de Évora,. Após um período de fixação em formol tamponado a 10% durante cinco dias, procedeu-se à descalcificação com ácido fórmico a 5% e ao corte longitudinal das amostras. O processamento foi efectuado manualmente, permitindo a monitorização rigorosa dos tempos de exposição a cada reagente. As amostras foram subsequentemente incluídas em parafina, cortadas com micrótomo e coradas com Hematoxilina-Eosina para observação microscópica.

A análise permitiu a identificação das principais camadas dentárias, evidenciando a eficácia do protocolo adoptado. Contudo, foram também observadas limitações, nomeadamente na preservação da polpa e na integridade de alguns tecidos, atribuíveis a constrangimentos metodológicos. Os resultados obtidos demonstram a viabilidade do protocolo proposto, com potencial de aplicação em futuras amostras, desde que se promovam melhorias na técnica de seccionamento e fixação inicial.

Palavras chave

Dente; descalcificação; ácido fórmico

Abstract

Teeth are complex structures made up of multiple tissue layers, among which enamel, dentin, cementum, and dental pulp stand out. These layers present a common pattern of organization and mineralization, which requires specific care in their histological preparation. The fixation and decalcification of teeth involve carefully controlled techniques to preserve the integrity of the soft tissues present, particularly the pulp.

The present work aimed to develop an accessible and efficient protocol for the histological preparation of dolphin teeth, adapted to the technical limitations of a conventional laboratory.

Dental samples were obtained from species of dolphins, as part of the research project conducted by the Marine Sciences Laboratory (CIEMAR), belonging to the University of Évora. After a period of fixation in 10% buffered formalin for five days, decalcification was carried out with 5% formic acid and longitudinal cutting of the samples. The processing was done manually, allowing for strict monitoring of the exposure times to each reagent. The samples were subsequently embedded in paraffin, cut with a microtome, and stained with Hematoxylin-Eosin for microscopic observation. Results: Microscopic observation of the obtained slides allowed for the observation and identification of the different layers of tissues constituting the processed tooth.

The analysis allowed for the identification of the main dental layers, highlighting the effectiveness of the adopted protocol. However, limitations were also observed, particularly in the preservation of the pulp and the integrity of some tissues, which are attributable to methodological constraints. The results obtained demonstrate the feasibility of the proposed protocol, with potential for application in future samples, provided that improvements are made in the sectioning technique and initial fixation.

Keywords

Tooth; decalcification; formic acid

Índice geral

1. Introdução.....	13
1.1 Esmalte.....	13
1.2 Dentina.....	14
1.3 Cimento.....	15
1.4 Polpa.....	16
2. Objetivos.....	17
3. Metodologia.....	18
3.1 Descalcificação e Seccionamento.....	18
3.2 Processamento.....	20
3.3 Inclusão e Corte.....	21
3.4 Coloração e Montagem.....	21
4. Resultados.....	22
5. Discussão e Conclusão.....	24
6. Referências Bibliográficas.....	25

Índice de figuras

Figura 1 — Representação das diferentes camadas anatómicas de um dente molar. (Husain, 2018)

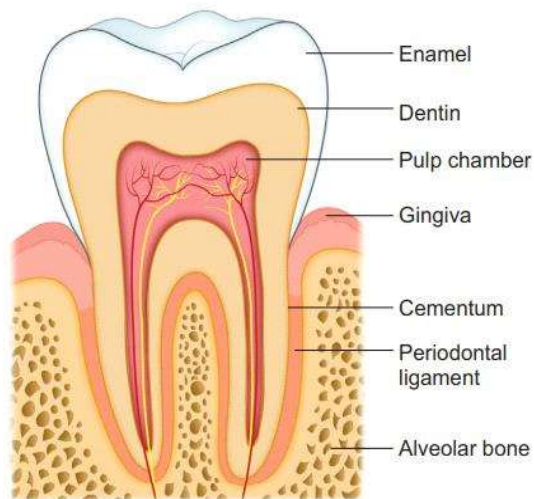


Figura 2 — Fixação das fibras de colágeno à dentina da raiz, e mineralização, resultando na formação do cimento radicular. (Bosshardt et al., 2015)

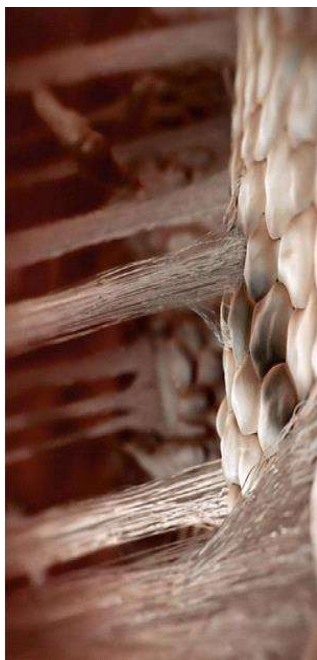


Figura 3 — (A): distância entre a junção amelocementária e a crista óssea alveolar no nível mais coronal do osso alveolar na face vestibular. Altura da crista alveolar lingual (B): distância entre a junção amelocementária e a crista óssea alveolar no nível mais coronal do osso alveolar na face lingual. (Calil et al., 2022) (C): local de realização do corte longitudinal

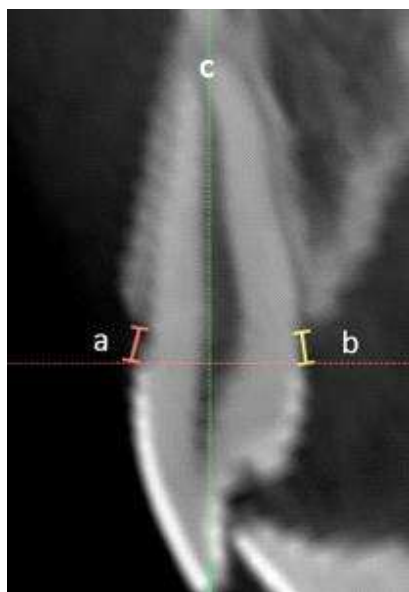


Figura 4 — Dentes em ácido fórmico



Figura 5 — Secção longitudinal do dente de golfinho.



Figura 6 — Processamento manual do dente de golfinho.



Figura 7 — Lâmina para observação microscópica do dente de golfinho.



Figura 8 — Observação microscópica do dente de golfinho. Ampliação total: 40x.

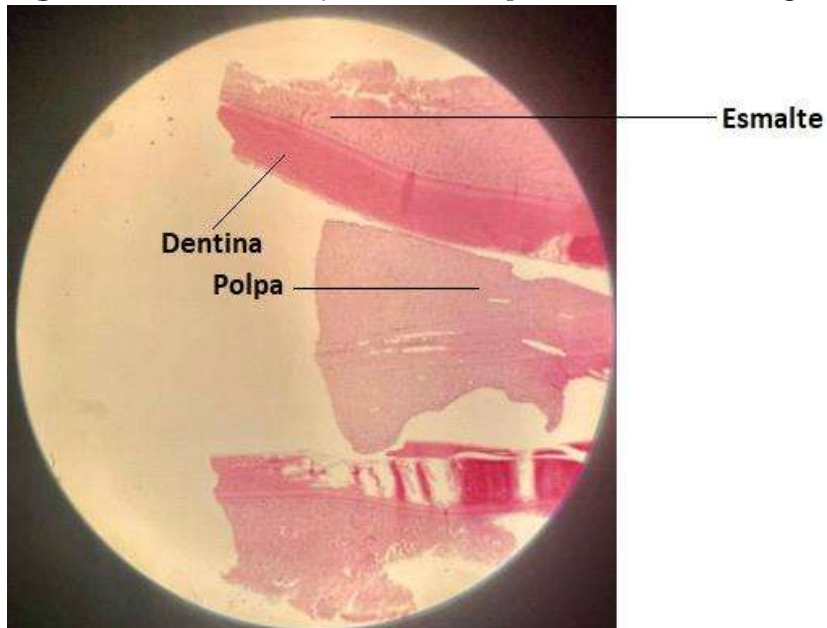
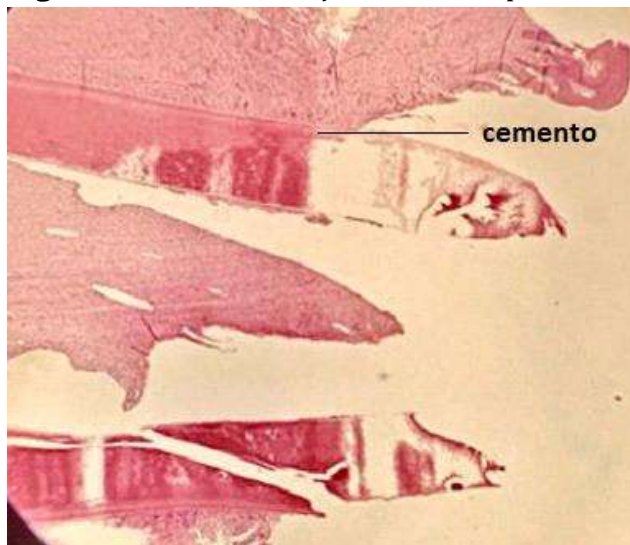


Figura 9 — Observação microscópica do dente de golfinho. Ampliação total: 40x.



Lista de tabelas

Tabela 1 — Composição geral da dentina. (Goldberg et al., 2012)

Fase mineral	70% em peso	40-45% em volume
Matrix orgânica	20% em peso	30% em volume
Água	10% em peso	20-25% em volume

Tabela 2 — Descalcificação do dente de golfinho.

Data de colocação	Tempo de permanência
13/11/2023	7h 54min
14/11/2023	8h 42min
16/11/2023	7h 13min
Tempo total em ácido fórmico a 5%	23h 49min

Tabela 3 — Etapas de processamento do dente de golfinho.

Reagente	Tempo de Permanência
Álcool 50%	30 minutos
Álcool 70%	30 minutos
Álcool 96%	15 minutos
Xilol	15 minutos
Xilol	30 minutos
Parafina	15 minutos
Parafina	30 minutos
Parafina	15 minutos

Lista de abreviaturas, siglas e acrónimos

HAP- cristais de hidroxiapatite

MEC - matriz extracelular

LPD – ligamento periodontal

1. Introdução

Os dentes são estruturas anatômicas duras do corpo, localizadas na cavidade oral, compostos por 2 componentes principais: a coroa e a raiz. O limite exato da coroa e da raiz de um dente é a junção amelocementária, que corresponde a uma linha visivelmente distinta entre o esmalte e o cemento. Na parte superior à junção, encontra-se a coroa, revestida por esmalte; e na parte inferior inferiormente, a raiz, revestida por cemento.

As 4 estruturas teciduais que constituem o dente são: esmalte, dentina, cemento e polpa (Fig. 1). Os 3 primeiros são tecidos duros mineralizados, enquanto a polpa é um tecido mole não mineralizado. (Husain, 2018)

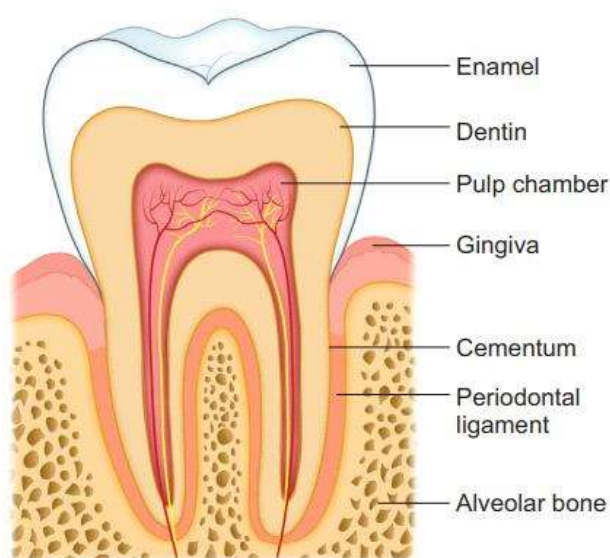


Figura 1 — Representação das diferentes camadas anatômicas de um dente molar. (Husain, 2018)

1.1 Esmalte

O esmalte que reveste a superfície externa da coroa dentária, é um tecido bastante mineralizado. (Husain, 2018) É constituído por cristais de hidroxiapatite (HAP) dispostos em placas de aproximadamente 40 a 70 nm, separadas por canais preenchidos por um fluido proteico de baixo peso molecular. (Lucas et al., 2015)

A formação do esmalte ocorre através de um processo secretor epitelial de múltiplas etapas que apresenta biomineralização, que é uma interação entre proteínas secretadas específicas do ameloblasto e o transporte temporal específico de minerais,

protões e bicarbonato. Inicialmente, os ameloblastos "secretores" formam toda a espessura da camada de esmalte, mas com baixo teor em minerais. Subsequentemente, diferenciam-se em ameloblastos de "maturação", que removem a matriz orgânica do esmalte e, por sua vez, acumulam cristais de hidroxiapatite.

O esmalte é composto por cerca de 96% de HAP, e uma pequena percentagem de proteínas e água. Esta estrutura apresenta elevada resistência mecânica, durante décadas, enquanto é exposto a mudanças constantes de temperatura, pH e a desafios microbianos sem capacidade de regeneração. (Varga et al., 2015)

Os HAP encontram-se organizados de uma forma bastante desordenada. Alguns cristais possuem ramificações laterais e formatos invulgares que permitem a interligação dos cristais, mantendo a coesão estrutural do esmalte. (Casteren & Crofts, 2019)

1.2 Dentina

Subjacente ao esmalte encontra-se a dentina, que compõe a maior parte da coroa e das raízes, e é um pouco menos calcificada que o esmalte. A dentina envolve os tecidos pulpaes dentro do dente. (Husain, 2018)

Apresenta uma estrutura tubular, Onde os túbulos desempenham diversas funções, incluindo a hidratação do dente, um canal para a transdução de sinais físicos para respostas sensoriais e como uma âncora na união adesiva. (Arola et al., 2017)

A dentina é composta por uma matriz de colagénio mineralizada que contém aproximadamente 30 a 50% em volume de material orgânico e aproximadamente 20% em volume de água (Tabela 1).

Tabela 1 — Composição geral da dentina. (Goldberg et al., 2012)

Fase mineral	70% em peso	40-45% em volume
Matrix orgânica	20% em peso	30% em volume
Água	10% em peso	20-25% em volume

A composição da dentina pode variar em diferentes áreas do dente, dependendo de sua proximidade com o tecido pulpar, bem como se a matriz está desmineralizada ou infetada por cárie. (Breschi et al., 2018) O colagénio tipo I é o principal componente do compartimento da matriz extracelular da dentina, representando até 90% do material orgânico, constituído por cristais de apatita inorgânica incorporados numa

matriz extracelular (MEC) A MEC é também constituída por cerca de 10% de proteínas. As proteínas não colagénicas da dentina incluem proteoglicanos, fosfolipídios e enzimas. (Mazzoni et al., 2015)

Os odontoblastos são as únicas células conhecidas capazes de formar a dentina. O osso e a dentina têm processos de mineralização semelhantes, durante os quais os odontoblastos secretam primeiramente matrizes não mineralizadas, denominadas dentina osteoide e dentina anterior, respetivamente. A matriz orgânica da dentina é secretada pelos odontoblastos e mineralizada na área da pré-dentina.

A dentina atua como uma câmara rígida que envolve a polpa, fornecendo suporte mecânico e proteção contra o ambiente oral rico em microrganismos. (Yu & Abbott, 2015), funcionando como barreira para evitar a exposição da polpa dentária, reduzir a condução de estímulos quentes e frios para a polpa e proteger a polpa viva. Além disso, ela também fornece uma base de tecido duro para restaurações dentárias posteriores. (Chen et al., 2022)

1.3 Cimento

Dentro das raízes dos dentes, o cimento é o tecido mais externo e reveste a dentina radicular, partilhando semelhanças na composição da dentina. O ponto de encontro entre o esmalte e o cimento compõe a junção amelocementária. Essa junção marca o limite entre a coroa e as raízes de um dente. (Husain, 2018)

A formação do cimento inicia-se com a diferenciação de células precursoras em cementoblastos. Os cementoblastos sintetizam, secretam e implantam uma densa franja de fibras de colagénio, o pré-cimento, na matriz do dente antes do início da mineralização. Após a implantação do pré-cimento, a matriz dentária mineraliza, seguida pela mineralização do pré-cimento (Figura 2).

O alongamento das fibras de colagénio, resulta na formação de uma rede de fibras, que garante a fixação do dente ao osso alveolar. (Bosshardt et al., 2015)

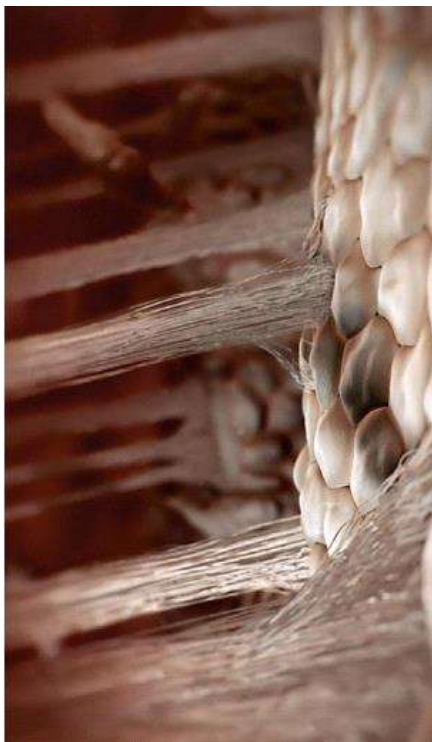


Figura 2 — Fixação das fibras de colágeno à dentina da raiz, e mineralização, resultando na formação do cimento radicular. (Bosshardt et al., 2015)

O cimento é um tecido avascular, inorgânico, denso, inerte e extremamente estreito, cuja principal função é proporcionar a fixação do dente à sua articulação. (Shukla et al., 2012)

O cimento da raiz do dente fornece fixação entre a raiz propriamente dita e o ligamento periodontal (LPD) circundante e o osso alveolar do alvéolo. Os dentes apresentam dois tipos principais de cimento, o acelular e o celular, que são distintos em localização e função. O cimento acelular ancora as fibras principais do LPD à superfície cervical da raiz e é fundamental para a fixação do dente e a função periodontal. O cimento celular envolve a porção apical da raiz e desempenha um papel adaptativo na manutenção do dente na sua posição oclusal. (Foster, 2017)

1.4 Polpa

A polpa dentária ocupa o espaço interno do dente, tanto a câmara pulpar quanto o canal radicular.

São tecidos compostos por nervos e vasos que entram pelo forame apical do dente, (Husain, 2018) derivada da proliferação e a condensação das células da crista neural (ectomesênquima).

A polpa madura apresenta forte semelhança com o tecido conjuntivo embrionário, com uma camada de células altamente especializadas, os odontoblastos, na sua periferia.

A polpa é um órgão sensorial que desempenha um papel importante no processo de defesa.

Os túbulos dentários são ocupados por fluidos e processos odontoblásticos, que se comportam coletivamente como um hidrogel carregado positivamente. O hidrogel é capaz de reter um grande número de bactérias que entram na polpa.

As células especializadas da polpa, os odontoblastos, mantêm a capacidade de formar dentina ao longo da vida. Isso permite que a polpa saudável compense parcialmente a perda de esmalte ou dentina causada por cáries ou desgaste dentário através da formação de uma barreira de tecido duro que isola os agentes corrosivos do tecido pulpar remanescente.

Independentemente da natureza dos estímulos sensoriais, como alteração térmica, deformação mecânica ou trauma, a polpa regista diferentes impulsos como uma sensação comum, ou seja, dor.

Essa capacidade de registar a dor é importante como parte dos mecanismos de defesa da polpa. (Yu & Abbott, 2007)

2. Objetivos

O presente trabalho teve como objetivo desenvolver e padronizar um protocolo para a observação histológica dos dentes de golfinho, adaptado aos recursos laboratoriais disponíveis, permitindo a identificação das principais estruturas dentárias e optimização dos métodos de fixação, descalcificação e coloração.

3. Metodologia

Para a obtenção de secções histológicas representativas das diversas estruturas dentárias foi realizado um corte longitudinal do dente, antes da fixação. (figura 3)

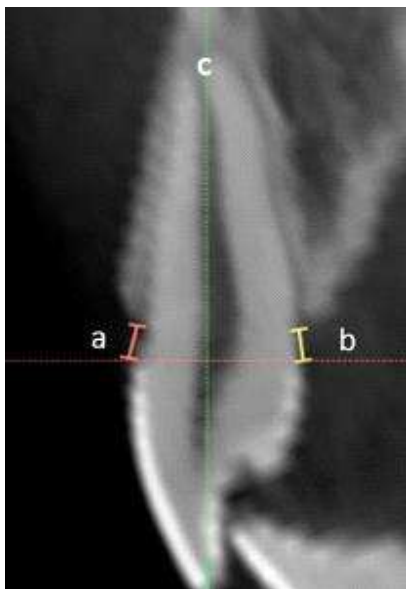


Figura 3 — (A): distância entre a junção amelocementária e a crista óssea alveolar no nível mais coronal do osso alveolar na face vestibular. Altura da crista alveolar lingual (B): distância entre a junção amelocementária e a crista óssea alveolar no nível mais coronal do osso alveolar na face lingual. (Calil et al., 2022)
(C): local de realização do corte longitudinal.

Após fixação em formol tamponado a 10%, durante 5 dias, procede-se à descalcificação, com o objetivo de remover os sais de cálcio e permitir a observação dos tecidos orgânicos. A descalcificação é monitorizada até o dente adquirir uma textura flexível, apta para corte com bisturi.

As amostras utilizadas foram obtidas de espécies de golfinhos, no âmbito do projeto de investigação realizado pelo Laboratório de Ciências do Mar (CIEMAR), pertencente à Universidade de Évora, localizado em Sines.

3.1 Descalcificação e Seccionamento

A descalcificação foi realizada vários dias após a fixação. Num frasco estéril (figura 4), a amostra foi submersa em ácido fórmico a 5%, de forma faseada, num total de aproximadamente 24 horas (Tabela 2), até o dente se encontrar flexível o suficiente para permitir o corte.

Para a descalcificação do dente humano pode ser utilizado ácido fórmico a 22,5%, no entanto, na impossibilidade de obter este reagente, foi utilizado o ácido fórmico a 5% como agente descalcificante. A utilização do ácido fórmico a 5% pareceu sugestiva devido às características macroscópicas do dente de golfinho, principalmente as dimensões, que são consideravelmente mais pequenas que as do dente humano.

Segundo Kumar et al. (2024), o dente canino humano possui, aproximadamente, 26,75 mm de comprimento e 7,7 mm de largura. A amostra dentária de dente de golfinho apresentava, aproximadamente, 10 mm de comprimento e 3 mm de largura.

Para o dente humano é utilizado um volume de 100 ml de solução descalcificadora (ácido fórmico a 22,5%), sendo esse mesmo volume de solução também aplicado ao dente de golfinho, porém na concentração de ácido fórmico a 5%.



Figura 4 — Dentes em ácido fórmico

Tabela 2 — Descalcificação do dente de golfinho.

Data de colocação	Tempo de permanência
13/11/2023	7h 54min
14/11/2023	8h 42min
16/11/2023	7h 13min
Tempo total em ácido fórmico a 5%	23h 49min

A amostra foi removida da solução de ácido fórmico e lavada com água destilada, procedendo-se ao corte longitudinal. (figura 5)



Figura 5 — Secção longitudinal do dente de golfinho.

3.2 Processamento

As amostras de dentes de golfinho foram colocadas dentro de cassetes e processadas manualmente (figura 6), de forma a ser possível ajustar o tempo de permanência em cada reagente, caso necessário.



Figura 6 — Processamento manual do dente de golfinho.

As técnicas de processamento clássicas são apropriadas para aplicação em tecidos dentários, no entanto, o período que a amostra permanece em cada etapa do processamento deve ser o menor possível, de forma a não provocar danos nas várias camadas do dente. O tempo excessivo de permanência em etanol, álcool ou xilol leva à desidratação excessiva dos dentes, endurecendo os tecidos constituintes. (Luque et al., 2009)

Tabela 3 — Etapas de processamento do dente de golfinho.

Reagente	Tempo de Permanência
Álcool 50%	30 minutos
Álcool 70%	30 minutos
Álcool 96%	15 minutos
Xilol	15 minutos
Xilol	30 minutos
Parafina	15 minutos
Parafina	30 minutos
Parafina	15 minutos

3.3 Inclusão e Corte

A inclusão dos dentes foi realizada em parafina, com a superfície de corte orientada para baixo. Após a solidificação da parafina, foram realizados cortes no micrótomo com uma espessura de 3 μm .

As lâminas obtidas foram colocadas na estufa a 37°C durante vários dias, garantindo a total aderência do corte à lâmina.

3.4 Coloração e Montagem

As secções histológicas obtidas foram coradas com a técnica Hematoxilina-Eosina, para melhor visualização das diferentes estruturas presentes na amostra. Os núcleos celulares são corados de azul pela hematoxilina e o citoplasma e tecido conjuntivo corados de diferentes tonalidades de rosa pela eosina. Posteriormente as secções histológicas foram observadas ao microscópio ótico para avaliação das mesmas.



Figura 7 — Lâmina para observação microscópica do dente de golfinho.

4. Resultados

Após a coloração com Hematoxilina-Eosina, as secções histológicas foram observadas ao Microscópio Ótico.

Na figura 8 e 9 estão representadas as quatro estruturas principais do dente: esmalte, dentina, polpa e cemento, obtidas após a otimização do protocolo. É visível, nas imagens, que ocorreu a desagregação da polpa.

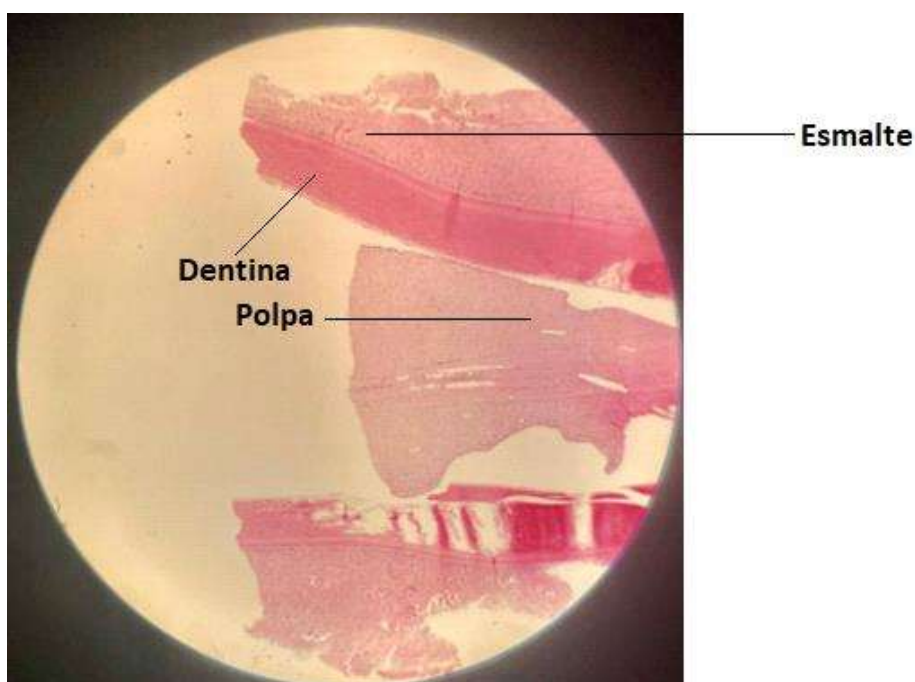


Figura 8 — Observação microscópica do dente de golfinho. Ampliação total: 40x.

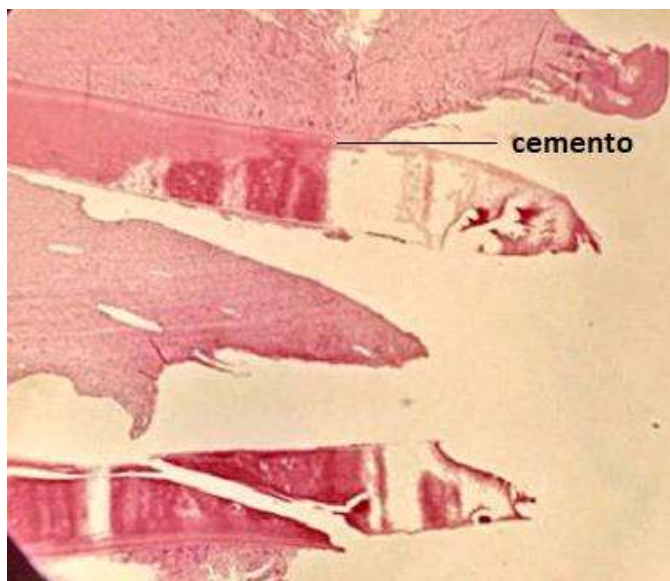


Figura 9 — Observação microscópica do dente de golfinho. Ampliação total: 40x.

Podemos ainda observar a destruição de partes dos tecidos, principalmente esmalte e dentina, que se deve ao uso do bisturi para o seccionamento do dente.

Os resultados obtidos foram no geral satisfatórios, ainda que com algumas alterações àquilo que seria o desejável, possivelmente devido à penetração do fixador que levou à contração concêntrica do tecido pulpar, conduzindo ao desprendimento da polpa relativamente à dentina (Widbiller et al., 2021).

5. Discussão e Conclusão

Apesar da existência de técnicas histológicas estabelecidas para os tecidos dentários, a escassez de literatura específica sobre técnicas histológicas aplicáveis a amostras de tecidos dentários de golfinho, bem como, detalhes técnicos acerca da fixação e descalcificação das amostras são escassos. (Widbiller et al., 2021)

A proximidade das camadas de tecidos moles e de tecidos mineralizados representa alguns desafios para a preparação histológica dos dentes de golfinho, assim, os procedimentos histológicos aplicados tiveram de ser adaptados em conformidade. A desmineralização dos dentes de golfinho, bem como, a desidratação, são passos indispensáveis ao processo que também requerem especial atenção, visto que, o excesso de desmineralização e desidratação pode danificar os tecidos constituintes do dente.

Após a aplicação do protocolo exposto foi possível observar as quatro principais estruturas dos dentes de golfinho, no entanto, a degradação da polpa observada nas imagens pode ser devida a uma má perfusão do fixador nos tecidos. Segundo Widbiller et al (2021), este fenómeno pode ser prevenido realizando uma perfuração numa área não relevante ou separando a coroa da raiz, facilitando a penetração do fixador nos tecidos e permitindo uma contração dos tecidos moles dirigida à respetiva área dentária, não alterando a estrutura do dente.

A destruição de partes dos tecidos deveu-se ao uso do bisturi para o seccionamento do dente. O seccionamento dos dentes deve ser realizado utilizando materiais que permitam o corte longitudinal do dente sem que a lâmina danifique as estruturas. Para tal, é sugerido o uso de materiais específicos, tais como, uma serra de diamante. (Luque et al., 2009)

A ausência de equipamentos especializados para corte e polimerização limitou a qualidade de preservação tecidular em algumas amostras. Futuros estudos poderão beneficiar da utilização de técnicas mais avançadas, como microtomia com serra de diamante ou descalcificantes com controlo automático de pH.

Seria interessante futuramente a visualização das lâminas numa objetiva de maior resolução para avaliar a preservação das estruturas celulares.

As limitações do laboratório, onde foi desenvolvido o projeto, em termos de equipamentos impuseram restrições técnicas, limitando a qualidade de preservação tecidular em algumas amostras. Contudo, foi possível estabelecer um protocolo viável e reproduzível para a observação histológica de dentes de golfinho, compatível com os recursos de um laboratório convencional de anatomia patológica.

6. Referências Bibliográficas

- Husain, M. A. (2018). Dental Anatomy and Nomenclature for the Radiologist. *Radiologic Clinics of North America*, 56(1), 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.rcl.2017.08.001> Accessed on 25 Feb. 2025
- Lucas, P. W., Philip, S. M., Al-Qeoud, D., Al-Draihim, N., Saji, S., & van Casteren, A. (2015). Structure and scale of the mechanics of mammalian dental enamel viewed from an evolutionary perspective. *Evolution & Development*, 18(1), 54–61. <https://doi.org/10.1111/ede.12169>
- Varga, G., Kerémi, B., Bori, E., & Földes, A. (2015). Function and repair of dental enamel - Potential role of epithelial transport processes of ameloblasts. *Pancreatology: Official Journal of the International Association of Pancreatology (IAP) ... [et Al.]*, 15(4 Suppl), S55–60. <https://doi.org/10.1016/j.pan.2015.01.012>
- He, L. H., & Swain, M. V. (2008). Understanding the mechanical behaviour of human enamel from its structural and compositional characteristics. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 1(1), 18–29. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2007.05.001>
- Casteren, A., & Crofts, S. B. (2019). The Materials of Mastication: Material Science of the Humble Tooth. *Integrative and Comparative Biology*. <https://doi.org/10.1093/icb/icz129>
- Arola, D. D., Gao, S., Zhang, H., & Masri, R. (2017). The Tooth. *Dental Clinics of North America*, 61(4), 651–668. <https://doi.org/10.1016/j.cden.2017.05.001>
Accessed on 12 Dec. 2024

- Goldberg, M., Kulkarni, A., Young, M., & Boskey, A. (2012). *Dentin: Structure, Composition and Mineralization: The role of dentin ECM in dentin formation and mineralization*.
<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3360947/pdf/nihms376994.pdf>
- Breschi, L., Maravic, T., Cunha, S. R., Comba, A., Cadenaro, M., Tjäderhane, L., Pashley, D. H., Tay, F. R., & Mazzoni, A. (2018). Dentin bonding systems: From dentin collagen structure to bond preservation and clinical applications. *Dental Materials*, 34(1), 78–96.
<https://doi.org/10.1016/j.dental.2017.11.005>
- Mazzoni, A., Tjäderhane, L., Checchi, V., Di Lenarda, R., Salo, T., Tay, F. R., & Breschi, L. (2015). *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine Evidence of MMPs in Dentin*.
https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4300303/pdf/10.1177_0022034514562833.pdf
- Chen, S., Xie, H., Zhao, S., Wang, S., Wei, X., & Liu, S. (2022a). The Genes Involved in Dentinogenesis. *Organogenesis*, 18(1). <https://doi.org/10.1080/15476278.2021.2022373>
- Yu, C., & Abbott, P. (2015). *dental pulp structure - Search Results - PubMed*. PubMed.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/?term=dental+pulp+structure>
- Bosshardt, D. D., Stadlinger, B., & Terheyden, H. (2015). Cell-to-cell communication - periodontal regeneration. *Clinical Oral Implants Research*, 26(3), 229–239.
<https://doi.org/10.1111/clr.12543>
- Shukla, D., Kale, A., & Hallikerimath, S. (2012). Cementum Made More Visual. *JOURNAL of FORENSIC ODONTO-STOMATOLOGY*, 30(1), 29–36.
<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5734845/pdf/JFOS-30-1-29.pdf>
- Foster, B. L. (2017). On the discovery of cementum. *Journal of Periodontal Research*, 52(4), 666–685. <https://doi.org/10.1111/jre.12444>

- Calil, L. R., Janson, G., Silva, V. M. da, Freitas, M. R. de, Almeida, A. L. P. F. de, & Garib, D. (2022). Periodontal status of maxillary central incisors after orthodontic traction: a longitudinal follow-up. *Journal of Applied Oral Science*, 30. <https://doi.org/10.1590/1678-7757-2021-0492>
- Kumar, S. M., Deepak Pandiar, Reshma Poothakulath Krishnan, & Ramya Ramadoss. (2024). Estimation of Tooth Dimensions and Golden Divine Ratio in Extracted Human Permanent Maxillary and Mandibular Canines in a Cohort of Tamil Ethnicity. *Cureus*. <https://doi.org/10.7759/cureus.54854>
- Luque, P. L., Learmonth, J. A., Santos, M. B., Ieno, E., & Pierce, G. J. (2009). Comparison of two histological techniques for age determination in small cetaceans. *Marine Mammal Science*, 25(4), 902–919. <https://doi.org/10.1111/j.1748-7692.2009.00304.x>
- Widbiller, M., Rothmaier, C., Saliter, D., Wölflick, M., Rosendahl, A., Buchalla, W., Schmalz, G., Spruss, T., & Galler, K. M. (2021). Histology of human teeth: Standard and specific staining methods revisited. *Archives of Oral Biology*, 127, 105136. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2021.105136>

